

Aus dem Institut für Humangenetik der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Mutationen von Genen des RAS-MAPK-Signalweges in kongenitalen Nävi

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Maximilian Ulrich

aus Magdeburg

Magdeburg 2022

Bibliographische Beschreibung:

Ulrich, Maximilian

Mutationen von Genen des RAS-MAPK-Signalweges in kongenitalen Nävi. - 2022. - 56 Bl., 8 Abb., 18 Tab.,

Kurzreferat:

Unter dem Begriff Mosaik-RASopathien wird eine Gruppe von (neuro-)kutanen Erkrankungen subsumiert, deren molekulargenetische Ursache aktivierende, somatische Mutationen in Genen des RAS-MAPK-Signalwegs darstellen. Teil dieser Erkrankungsgruppe sind die in der Dissertation untersuchten kongenitalen Nävi sowie die damit assoziierten neurokutanen Syndrome, wie die Neurokutane Melanose, das Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndrom, die Enzephalokraniokutane Lipomatose und das Okuloektodermale Syndrom. Die Aufklärung der molekulargenetischen Ursachen dieser Entitäten und die damit einhergehende Klassifizierung als Mosaik-RASopathien erfolgte ab dem Jahr 2012 durch verschiedene Arbeitsgruppen. In dieser Dissertation wurden an insgesamt 108 Proben verschiedener Nävusentitäten Mutationsanalysen sowohl mit Hilfe konventioneller Sanger-Sequenzierung als auch NGS-basierter-Panelsequenzierung durchgeführt. Bei dem Großteil der Proben konnten Mutationen in den Genen NRAS, HRAS, KRAS, BRAF, EGFR und FGFR3 gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigen den aktuellen Wissenstand im Bereich der kutanen Mosaik-RASopathien. In einigen Nävi wurden neue mögliche Kandidatenmutationen detektiert, deren Bedeutung in weiteren Forschungsarbeiten untersucht werden muss.

Zusätzlich konnte ein Fall eines seltenen komplexen Nävussyndroms, das phänotypische Merkmale eines kongenitalen melanozytären Nävussyndroms und einer Enzephalokraniokutanen Lipomatose vereinte, die durch die Untersuchung verschiedener läsionaler Gewebeproben molekulargenetisch charakterisiert werden. Damit konnte belegt werden, dass der kombinierte Phänotyp allein durch eine, vermutlich in der Embryonalentwicklung früh entstandene, NRAS-Mutation (c.181C>A p. Gln61Lys) hervorgerufen wurden.

Schlüsselwörter:

Mosaik-RASopathien, CMN, KEN, NRAS, BRAF, HRAS

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung

- 1.1. Begriffsbestimmung und Einteilung von Nävi
 - 1.1.1. Entstehung und Klinik melanozytärer Nävi
 - 1.1.2. Entstehung und Klinik epidermaler Nävi
 - 1.1.3. Entstehung und Klinik organoider Nävi
 - 1.1.4. Entstehung und Klinik Talgdrüsenhyperplasien
- 1.2. Systematisierte Nävi und Epidermalnävussyndrome
 - 1.2.1. Neurokutane Melanose
 - 1.2.2. Enzephalokraniokutane Lipomatose
 - 1.2.3. Okuloektodermales Syndrom
- 1.3. Tumorassoziation der Nävusentitäten
- 1.4. Molekularbiologie der Nävi
 - 1.4.1. RAS-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg
 - 1.4.2. RASopathien
 - 1.4.3. Mosaik-RASopathien
 - 1.4.4. Mutationsspektrum der kongenitalen melanozytären Nävi und der Neurokutanen Melanose
 - 1.4.5. Mutationsspektrum der keratinozytären epidermalen Nävi
 - 1.4.6. Mutationsspektrum des Naevus sebaceus, des Schimmelpenning-Syndroms und der Talgdrüsenhyperplasien
 - 1.4.7. Mutationsspektrum der Enzephalokraniokutanen Lipomatose
 - 1.4.8. Mutationsspektrum des Okuloektodermalen Syndroms
- 1.5. Zielsetzung

2. Material und Methoden

- 2.1. Patienten und Untersuchungsmaterial
- 2.2. Auswahl der Sequenzierungsmethode
- 2.3. Methoden
 - 2.3.1. DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung
 - 2.3.2. Amplifikation der DNA mittels PCR
 - 2.3.3. Gelelektrophorese
 - 2.3.4. Aufreinigung der PCR-Produkte
 - 2.3.5. Sequenzierung
 - 2.3.6. Aufreinigung und Auswertung der Sequenzierung

2.3.7. NGS-basierte Panel-Diagnostik

2.3.7.1. Messung der DNA-Konzentration

2.3.7.2. Real-Time quantitative PCR

2.3.7.3. Next-Generation Sequencing

2.3.7.4. Datenanalyse der Panel-Diagnostik

2.4. Material

2.4.1. Reagenzien

2.4.2. Lösungen

2.4.3. Geräte

2.4.4. Software

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Methodik

3.2. Ergebnisse der CMN

3.2.1. Ergebnisse der CMN per Sanger-Sequenzierung

3.2.2. Ergebnisse der CMN per NGS-basierter Panel-Diagnostik

3.3. Ergebnisse der keratinozytischen epidermalen Nävi

3.4. Ergebnisse der Talgdrüsenhyperplasien

3.5. Ergebnisse eines komplexen Nävussyndroms

3.6. Ergebnisse MM auf CMN

4. Diskussion

4.1. Kongenitale Nävi und Mosaik-RASopathien

4.1.1. Beurteilung der Mutationen kongenitaler melanozytärer Nävi

4.1.2. Beurteilung der Mutationen keratinozytärer epidermaler Nävi

4.1.3. Beurteilung der Mutationen der Talgdrüsenhyperplasien

4.2. Beurteilung der Mutationen beim komplexen Nävussyndrom

4.3. Beurteilung der Mutationen der MM auf CMN

4.4. Proben ohne Mutationen

4.5. Ausblick

5. Zusammenfassung

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
BRAF	Gen: V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CMN	Kongenitaler melanozytärer Nävus
CTNNB1	Gen: CADHERIN-ASSOCIATED PROTEIN
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECCL	Enzephalokraniokutane Lipomatose
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
EN	Epidermalsnävus
FFPE	Formalin-fixiertes-Paraffin-eingebettet
g	Gramm
GAP	GTPase activating proteins
GCMN	Riesiger kongenitaler melanozytärer Nävus
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanidine exchange factors
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRAS	Gen: V-HA-RAS HARVEY RAT SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
KEN	Keratinozytischer epidermaler Nävus
KRAS	Gen: V-KI-RAS2 KIRSTEN RAT SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
l	Liter
LCMN	Großer kongenitaler melanozytärer Nävus
M	Molar
MCMN	Mittelgroßer kongenitaler melanozytärer Nävus

min	Minute
m	milli, 10 ⁻³
MM	Malignes Melanom
NCM	Neurokutane Melanose
NGS	Next-Generation-Sequencing
NRAS	Gen: NEUROBLASTOMA RAS VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
NS	Nevus sebaceus
OES	Okuloektodermales Syndrom
PAS	projected adult size
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qPCR	Real-Time quantitative PCR
RHOA	Gen: APLYSIA RAS-RELATED HOMOLOG
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SCMN	Kleiner kongenitaler melanozytärer Nävus
Sec	Sekunde
SGH	Talgdrüsenhyperplasie
U	Unit
UV	Ultra-violet
VAF	Variant Allel Frequency
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Begriffsbestimmung und Einteilung von Nävi

Eine allgemein akzeptierte Definition des Begriffes Nävus (deutsch Muttermal) ist bis heute nicht etabliert. Generell bezeichnet ein Nävus eine gutartige, sichtbare und umschriebene Fehlbildung der Haut oder angrenzender Schleimhäute, die aufgrund eines genetischen Mosaik entsteht (Happle, 1995).

Dabei können Nävi einerseits bereits bei der Geburt vorhanden sein (kongenitale Nävi) oder andererseits erst im Laufe der Entwicklung manifest werden (erworbene Nävi). Je nach Ursprungsgewebe der Nävi unterscheidet man melanozytäre, epidermale, vaskuläre und Bindegewebsnävi. Des Weiteren kann man nach dem Ausbreitungsmuster zwischen isolierten (singulären) Nävi und systematisierten Nävi, bei denen sich die Läsion in mehreren Körperregionen manifestieren, unterscheiden.

1.1.1 Entstehung und Klinik melanozytärer Nävi

Melanozytäre Nävi (oder auch Pigmentzellnävi) sind benigne Tumoren der Haut, die durch Proliferation von Melanozyten der Epidermis bzw. Dermis, die auch als Nävuszellen bezeichnet werden, entstehen. Dabei wandern die Melanozyten während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste in die Epidermis ein. Sie können aber auch im Rahmen von Fehlentwicklungen in der Dermis verbleiben und hier zu dermalen melanozytären Nävi werden. Die Frage, inwieweit es sich bei melanozytären Nävi um genetisch determinierte Fehlbindungen (Hamartome) oder um benigne Tumoren der basalen Melanozyten der Epidermis handelt, ist nicht endgültig geklärt und Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion (Barnhill et al., 2010).

Melanozytäre Nävi können anhand von klinischen und histologischen Merkmalen in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Man unterscheidet klinisch kongenitale melanozytäre Nävi (CMN, MIM #137550) von während des Lebens erworbenen melanozytären Nävi, die meist in der 1. und 2. Dekade auftreten („Leberflecke“).

CMN treten bei ca. 1-2% aller Neugeborenen auf (Berg & Lindelöf, 2003). Sie entstehen aufgrund somatischer Mutationen melanozytärer Vorläuferzellen der Neuralleiste, die später in die Haut migrieren und dort das klinische Bild des CMN hervorrufen. (Kinsler et al., 2013). Klinisch werden CMN üblicherweise nach ihrer maximalen Ausdehnung (Durchmesser in cm)

klassifiziert (Krengel et al., 2013). Um die Größen von CMN in verschiedenen Altersklassen zu vergleichen, kann anhand von epidemiologischen Wachstumsdiagrammen die „projected adult size“ (PAS) ermittelt werden. Dies ist sinnvoll, da sich CMN proportional zum Längenwachstum des Patienten ausdehnen. Man unterscheidet in kleine (SCMN, bis 1,5cm), mittelgroße (MCMN, 1,5-20cm), große (LCMN, >20-40cm) und riesige (GCMN, >40cm) CMN. Eine seltene Entität stellen die mutiplen, mittelgroßen CMN dar, bei der mehrere etwa gleich große CMN (≥ 3 cm) auftreten.

Neben dem Hauptnävus finden sich besonders bei LCMN, GCMN sowie der Neurokutanen Melanose kleinere, meist über den ganzen Körper verteilte CMN, die sogenannten Satellitennävi.

1.1.2 Entstehung und Klinik epidermaler Nävi

Epidermale Nävi (EN, MIM #162900) sind angeborene oder in den ersten Lebensjahren auftretende Mosaikmanifestationen der Epidermis oder ihrer Anhangsgebilde, wobei die Nävi der Epidermis als nicht-organoide Epidermalnävi oder keratinozytäre epidermale Nävi (KEN) und die Nävi mit Beteiligung der Strukturen der Adnexe als zusammengesetzte oder organoide Nävi bezeichnet werden (Hafner et al., 2014).

Die keratinozytischen Nävi imponieren aufgrund ihrer keratinozytären Herkunft hautfarben bis hellbraun und stellen sich klinisch als papillomatös-hyperkeratotisch bis verruköse Veränderungen dar. Sie treten meist streifenförmig auf und folgen dabei den Ausrichtungen der Blaschko-Linien.

1.1.3 Entstehung und Klinik organoider Nävi

Organoide Nävi entstehen durch eine Vermehrung oder Veränderung der Hautadnexe. Je nach Herkunft (Haarfollikel, Talgdrüsen, Schweißdrüsen) können eine Vielzahl von verschiedenen Subtypen klinisch und histologisch differenziert werden (Hafner et al., 2014).

Der häufigste organoide Nävus ist der Naevus sebaceus (NS, MIM #162900), der vor allem Veränderungen der Epidermis, der Haarfollikel sowie des Talg- und Schweißdrüsenapparates aufweist. Nach der Geburt ist der Nävus als weißlich-gelbe, oberflächenglatte, leicht erhabene und stets haarlose Plaque zu erkennen. Über 90% der Nävi treten am Kapillitium auf und sind dort zunächst durch eine zirkumskripte Alopezie charakterisiert. Unter dem Einfluss der Androgene während der Pubertät entwickelt sich, aufgrund des Talgdrüsenwachstums, eine

weiterhin unbehaarte, warzige, gelb-rote bis gelb-bräunliche Plaque mit schwammig-fester Konsistenz. Im späteren Erwachsenenalter stellt sich eine vermehrt verruköse Oberfläche dar.

1.1.4 Entstehung und Klinik Talgdrüsenhyperplasien

Talgdrüsenhyperplasien („sebaceous gland hyperplasia“, SGH) sind häufig auftretende benigne Hauttumoren, die bevorzugt im Gesicht älterer Menschen mit ausgeprägter Seborrhö lokalisiert sind. Das Auftreten der Tumoren wird durch Immunsuppression, eine Behandlung mit Ciclosporin oder unter Dialyse begünstigt. Klinisch imponieren sie als kleine gelbliche polynoduläre Tumoren mit zentraler Nabelung ohne Ulzeration. Der charakteristische Nabel entspricht einem zystisch dilatierten Infundibulum eines Haarfollikels, um den sich Proliferate von Talgdrüsenläppchen gruppieren. Ursächlich für die Proliferation sind wahrscheinlich verminderte Androgenspiegel, die mit einer reduzierten Sebumproduktion einhergeht. Dies führt über einen Feedbackmechanismus zu einer Proliferation der Sebozyten und damit zur Hyperplasie der Talgdrüsen (Iacobelli et al., 2017).

1.2 Neurokutane Syndrome

Neurokutane Syndrome sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich durch das Vorliegen kutaner sowie zentral- bzw. peripherenervöser Läsionen definieren lassen (Ruggieri & Praticò, 2015).

Zu den häufigsten neurokutanen Syndromen zählen neben der Neurofibromatose Typ 1 sowie der Tuberösen Sklerose auch das Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndrom. Die Neurokutane Melanose, die Enzephalokraniokutane Lipomatose sowie das Okuloektodermale Syndrom gehören zu den selteneren Entitäten der neurokutanen Syndrome. Allerdings sind sie, auch aufgrund der Zugehörigkeit zu den Mosaik-RASopathien, im besonderen Forschungsinteresse des Instituts für Humangenetik der Universität Magdeburg.

1.2.1 Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndrom

Das Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndrom (SFM, MIM #163200) gehört zu den kongenitalen, neurokutanen Erkrankungen. 1957 beschrieb der Neurologe Gustav Schimmelpenning den ersten Fall eines epidermalen Naevus in Zusammenhang mit neurologischen Auffälligkeiten (Schimmelpenning, 1957). Die Pädiater Feuerstein und Mims beschrieben 1962 einen Fall eines Patienten mit linearen Naevus, Epilepsie und mentaler Retardierung (Feuerstein & Mims, 1962).

Das dermatologische Hauptmerkmal des SFM-Syndroms ist der Naevus sebaceus, der in über 90% der Fälle am Capilitium oder dem Gesicht auftritt (Jaqueti et al., 2000). Neben den dermatologischen Auffälligkeiten zeigen Patienten mit SFM-Syndrom auch extrakutane Manifestationen, die in der Mehrzahl der Fälle ipsilateral zum Hamartom auftreten. Die Mehrzahl (66%) der Patienten weisen neurologische Auffälligkeiten, wie z.B. mentale Retardierung, Krampfanfälle und Hemiparesen, auf (van de Warrenburg et al., 1998). Ophthalmologische Anomalien, am häufigsten Choristome und Colobome, treten bei ca. 59% der Erkrankten auf (Insler & Davlin, 1987). Weiterhin wurden als extrakutane Manifestation Veränderungen des Skelettsystems beschrieben (Heike et al., 2005).

1.2.2 Neurokutane Melanose

Die neurokutane Melanose bzw. Melanozytose (NCM, MIM #249400) ist ein sehr seltenes, kongenitales Krankheitsbild. Die Erstbeschreibung erfolgte im Jahr 1861 durch Graf Carl von Rokitansky, der einen „ausgezeichnete(n) Fall von Pigment-Mal mit ausgebreiteter Pigmentierung der inneren Hirn- und Rückenmarkshäute“ bei einem 14-jährigen Mädchen beschrieb.

Im Jahr 1991 erneuerten Kadonaga und Frieden die Diagnosekriterien für die NCM, die folgende Merkmale beinhalten:

- Großer (>20cm) oder multiple (3 oder mehr) CMN in Verbindung mit benigner oder maligner Proliferation der Melanozyten des zentralen Nervensystems (ZNS)
- Bei Neugeborenen muss die Größe des CMN 9cm am Kopf bzw. 6cm am Körper übersteigen

- Kein Anhalt für ein kutanes Melanom, außer bei histologisch bestätigter Benignität der leptomeningealen Läsionen
- Kein Anhalt für ein meningeales Melanom, außer bei histologisch bestätigter Benignität der kutanen Läsionen (Kadonaga & Frieden 1991)

Neben der Migration in die Dermis, wandert auch ein Teil melanozytärer Vorläuferzellen der Neuralleiste in das ZNS aus. Findet während der frühen Embryogenese eine somatische Mutation in den Vorläuferzellen statt, so entstehen auch im ZNS melanozytäre Proliferationen. Diese Läsionen betreffen in den häufigsten Fällen das Rückenmark und die Leptomeningen. In ca. 2,3% entwickelt sich aus den benignen, meningealen Melanozytenansammlungen ein leptomeningeeales Melanom (Hale et al., 2005).

Die Diagnose NCM wird durch das Auftreten von einem oder mehreren CMN und die neuroradiologische Sicherung von nävoiden, melanozytären Läsionen des ZNS gesichert (Kadonaga & Frieden, 1991). Mit der Schwere der Ausprägung des Hautphänotyps (z.B. Durchmesser der Nävi und Anzahl der Satellitennävi) steigt die Wahrscheinlichkeit von neuroradiologischen Auffälligkeiten (Kadonaga & Frieden, 1991; Ramaswamy et al., 2012). Die Lokalisation des CMN im Nacken- und Kopfbereich, sowie über dem Rückenmark erhöhen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der NCM ebenfalls (Ramaswamy et al., 2012).

Die Mehrheit der Patienten die an der NCM leiden, entwickeln innerhalb der ersten fünf Lebensjahre neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, Krampfanfälle, erhöhten intrakraniellen Druck und Hydrozephalus (Ramaswamy et al., 2012). In der Kohorte von Bett zeigten 29 der 45 Probanden (64%), mit einer gesicherten NCM, neurologische Auffälligkeiten. 34% der symptomatischen Patienten starben an neurologischen Ursachen oder ZNS-Melanomen (Bett, 2006).

Neben den melanozytären gibt es auch einen großen Anteil nicht-melanozytärer ZNS-Läsionen (Arachnoideazysten, Hydrozephalus etc.), die im Zusammenhang mit den CMN stehen. Für diesen Symptomkomplex, bei dem kein Nachweis einer melanozytären Infiltration des ZNS gelingt, wird der Begriff kongenitales melanozytäres Nävussndrom (CMNS, MIM #137550) verwandt (Kinsler et al., 2012; Kinsler et al., 2013).

1.2.3 Enzephalokraniokutane Lipomatose

Die Enzephalokraniokutane Lipomatose (ECCL, MIM #613001) ist ein seltenes Syndrom, das 1970 erstmals von Haberland und Perou beschrieben wurde (Haberland & Perou, 1970). Klinisch ist die ECCL durch okuläre, dermale und zentralnervöse Anomalien gekennzeichnet. Der Nävus psiloliparis, eine vom Fettgewebe ausgehende, fleckenförmige, haarlose, gelbe bis rot getönte Fehlbildung der Kopfhaut stellt das charakteristische dermatologische Erkennungszeichen der ECCL dar und ist bei ca. 80% der Erkrankten zu finden (Happle & Küster, 1998). Zentralnervös findet man intrakranielle und intraspinale Lipome, Arachnoideazysten sowie Dysplasien und Verkalkungen des Kortex. Diese Anomalien des ZNS können zu neurologischen Symptomen, wie z.B. Krampfanfällen oder Gesichtslähmungen, führen. Dabei differiert die geistige Leistungsfähigkeit der Patienten zwischen einem normalen Intelligenzquotienten bis hin zur schweren geistigen Behinderung (Moog et al., 2007). Choristome wie z.B. epibulbäre Dermoiden sind die häufigsten ophthalmologischen Symptome der ECCL. Diese findet man auch bei dem Oculoectodermalen Syndrom, das als mildere Form der ECCL diskutiert wurde (Ardinger et al., 2007).

1.2.4 Okuloektodermales Syndrom

Das Okuloektodermale Syndrom (OES, MIM 600268) ist ein sehr seltenes Syndrom, das erstmalig 1993 von Toriello et. al bei zwei nicht verwandten Patienten beschrieben wurde (Toriello et al., 1993). Das typische klinische Erscheinungsbild des OES ist die Kombination aus epibulbären Dermoiden und kongenitalen Skalpdefekten in Sinne einer Aplasia cutis congenita. Zusätzlich treten Hyperpigmentierungen der Haut auf, die den Blaschko-Linien folgen, in selteneren Fällen auch epidermale nävusähnliche Läsionen. Die epibulbären Dermoiden können ein- oder beidseitig auftreten. Weitere okuläre Anomalien sind Hautanhängsel am oberen Augenlid, Veränderungen der Retina und der Sehnerven. Dabei ist phänotypische Ausprägung interindividuell sehr variabel und es wurden viele weitere Anomalien, wie z.B. Wachstumsfehler, Lymphödeme, kardiovaskuläre Defekte, Verhaltensauffälligkeiten und Epilepsien beschrieben (Ardinger et al., 2007).

1.3 Tumorassoziation der Nävusentitäten

CMN zählen zu den prämaligen Läsionen mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines malignen Melanoms (MM), besonders in der Kindheit. Das Lebenszeitrisiko, bei Patienten mit CMN, an einem Melanom zu erkranken, wird mit 1-2% geschätzt. Allerdings nimmt das Risiko mit der Schwere des Phänotyps zu und erreicht in GCMN 10-15% (Kinsler et al., 2008; Krengel et al., 2006). Ebenfalls mit einer höheren Melanomassoziation verknüpft, sind CMN mit Satellitennävi und die mutiplen, mittelgroßen CMN (Neuhold et al., 2015). Ein wesentlicher Anteil der Melanome entwickelt sich dabei nicht in der Haut, sondern im ZNS (Hale et al., 2005; Kinsler et al., 2017; Krengel et al., 2006; Neuhold et al., 2015)

Auf dem Boden eines Nävus sebaceus können sowohl benigne als auch maligne Tumoren entstehen. In einer 2012 von Moody et al. veröffentlichten Metaanalyse mit 4900 Proben von Naevi sebacei wurden in ca. einem Viertel aller Fälle sekundäre Tumoren gefunden (Moody et al., 2012). Die meisten benignen Tumore, die auf NS entstehen, sind Trichoblastome und andere basaloide Proliferationen. Allerdings wurden auch einige Fällen publiziert, in denen maligne Tumoren, insbesondere Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome, auf dem Grund eines NS entstanden sind (Idriss & Elston, 2014).

Auch für die KEN gibt es Beobachtungen über eine Assoziation mit Karzinomen. Bislang sind vor allem maligne Tumoren des Harntraktes beschrieben worden (Flosadóttir & Bjarnason, 2008; Hafner et al., 2011). Durch Mutationsanalysen konnte in einigen Fällen die gleiche HRAS-Mutation sowohl im KEN als auch im Karzinom detektiert werden.

1.4 Molekularbiologie der Nävi

1.4.1 RAS-MAP-Kinase Signaltransduktionsweg

Der RAS-MAPK-Signaltransduktionsweg ist einer der wichtigsten Signalwege des Menschen und reguliert ein weites Spektrum an intrazellulären Prozessen, wie die Zellproliferation und -differenzierung, die Antwort auf Stressoren und die Apoptose (Jafry & Sidbury, 2020).

Durch Bindung von Liganden, wie z.B. den *Epidermal Growth Factor* (EGF) an transmembranöse Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) wird der Signalweg aktiviert. Über diese Kinasen werden RAS-Proteine aktiviert und damit die intrazelluläre Signalweiterleitung ermöglicht. Ras-Proteine gehören zu den monomeren G-Proteinen und fungieren als molekulare Schalter (Kano et al., 2019). RAS kann dabei in zwei Konfigurationen vorliegen. Im GTP-gebundenen Zustand sind die Ras-Proteine aktiv und leiten das intrazelluläre Signal

weiter, während sie im GDP-gebundenen Stadium inaktiv sind. Die Aktivierung erfolgt über *Guanine nucleotide exchange factors* (GEF), die den Austausch des gebundenen GDP zu GTP katalysieren. Die Inaktivierung erfolgt hingegen über die intrinsische Hydrolyseaktivität der Ras-Proteine, die durch *GTPase activating proteins* (GAP) beschleunigt wird und die dadurch hervorgerufene Dephosphorylierung von GTP zu GDP katalysieren (Kano et al., 2019). Aktiviertes RAS kann die RAF-Proteinkinasen direkt aktivieren, die die Kinasen MEK 1/2 phosphorylieren, die dann wiederum die MAP-Kinasen ERK 1/2 phosphorylieren. ERK 1/2 aktivieren dann u.a. Transkriptionsfaktoren, die die Proliferation und Differenzierung der Zelle als auch die Apoptose beeinflusst, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Über eine negative Rückkopplung werden die GAP's aktiviert, das GTP-gebundene RAS dephosphoryliert und somit die dauerhafte „Downstream“ Aktivierung des Signalweges gestoppt.

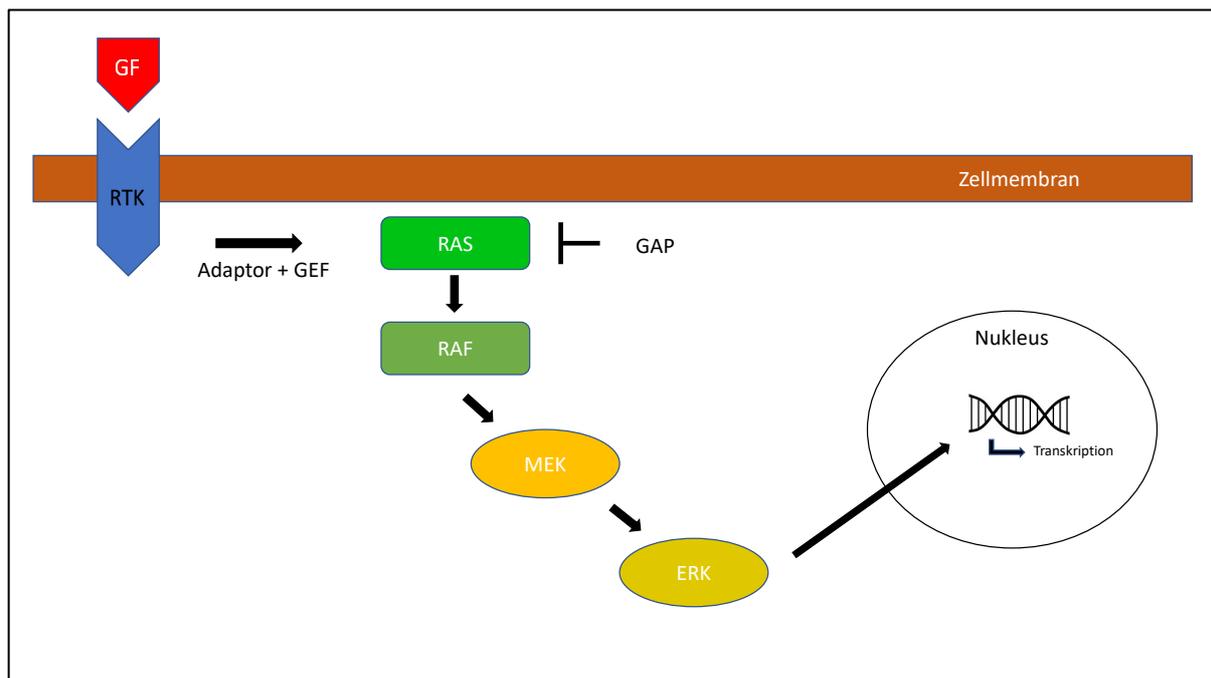


Abb. 1: Schematische Darstellung des RAS-MAP-Kinase Signaltransduktionswegs nach (Thatcher, 2010)

Aktivierende (onkogene) RAS-Mutationen treten häufig in den hochkonservierten Regionen an Kodon 12, 13 und 61 auf. Punktmutationen, die im Austausch des Glycins in Kodon 12 bzw. 13 resultieren, führen zur Inhibition der GAP-Bindung an RAS und verhindern damit die Inaktivierung von RAS durch die Hydrolyse von GTP zu GDP. Da das Kodon 61 für die Hydrolyseaktivität des RAS mitverantwortlich ist, führen Mutationen an dieser Stelle zur Ineffektivität der intrinsischen als auch der GAP-vermittelten Hydrolyse. Die Mutationen

resultieren somit in einer fehlenden negativen Rückkopplung mit dauerhafter Aktivierung des Signalweges (Simanshu et al., 2017). Durch die zentrale Bedeutung der RAS-Proteine im zellulären Signalweg spielen Mutationen in diesen Genen eine große Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheiten. Die RAS-Gene gelten schon seit langem als Protoonkogene (Bos, 1989). So sind an 30% aller menschlichen Krebserkrankungen somatische, aktivierende RAS-Mutation beteiligt (Schubbert et al., 2007).

Auch die RAF-Gene sind als Protoonkogene bekannt. Die häufigste onkogene Mutation im BRAF-Gen ist der Austausch der Aminosäuren Valin zu Glutamat am Kodon 600 (V600E). Die Mutation führt zur RAS-unabhängigen Aktivierung von BRAF mit konsekutiver Downstream Aktivierung des Signalweges. Dies führt, ähnlich wie oben für Ras beschrieben, zu einer fehlenden negativen Rückkopplung und unkontrollierter Zellproliferation (Ritt et al., 2010). Besonders bei der Pathogenese von malignen Melanomen und CMN spielt die Mutation V600E des BRAF-Gens eine entscheidende Rolle.

1.4.2 RASopathien

RASopathien stellen eine Gruppe von kongenitalen Entwicklungsstörungen dar, die aufgrund von Keimbahnmutationen im RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg entstehen (Tidyman & Rauen, 2009). Da alle RASopathien den RAS-MAPK-Signalweg beeinflussen, weisen sie gemeinsame phänotypische Korrelate auf; dazu gehören kraniofaciale Dysmorphologien, Herzfehler, Wachstumsstörungen, neurokognitive Einschränkungen, ein erhöhtes Tumorrisiko sowie kutane, muskuloskeletale und okuläre Missbildungen. Trotzdem besitzt jede RASopathie einen für die Krankheit spezifischen Phänotyp (Rauen, 2013). Zu den RASopathien gehören Erkrankungen wie z.B. Noonan Syndrom, Neurofibromatose Typ 1, Costello-Syndrom, LEOPARD-Syndrom, ein vaskuläres Malformations-Syndrom u.a.. Bei den meisten genetischen Veränderungen, die mit RASopathien assoziiert sind, handelt es sich um heterozygote Mutationen, die den RAS-MAPK-Signalweg aktivieren und autosomal-dominant vererbt werden können. (Hafner & Groesser, 2013). Ein Großteil dieser Mutationen weist in der Art und in ihrer Verteilung über die jeweiligen Gene Ähnlichkeiten zu den mit Tumoren assoziierten somatischen Mutationen des RAS-MAPK-Signalweges auf. Allerdings wird angenommen und ist für einzelne mutante Proteine auch belegt, dass die Keimbahnmutationen den Signalweg deutlich weniger stark aktivieren. Eine ähnlich starke Aktivierung des

Signalweges, wie durch die somatischen Mutationen, die typischerweise in Tumoren auftritt, scheint in der Keimbahn bzw. in den frühen Entwicklungsphasen nicht tolerabel zu sein (Rauen, 2013).

1.4.3. Mosaik-RASopathien

Das genetische Mosaik ist durch das Vorkommen von mindestens zwei genetisch unterschiedlichen Zellpopulationen in einem Gewebe bzw. einem Organismus definiert. Genetische Mosaik entstehen aufgrund postzygotischer Mutationen, wobei der klinische Phänotyp durch den Zeitpunkt der Mutation, die funktionellen Auswirkungen der Mutation (im Falle von RAS-Signalweg-Mutationen die Art und Stärke der Aktivierung) sowie der betroffenen Zelllinie bestimmt wird (Hafner & Groesser, 2013). Als Mosaik-RASopathie wird dabei eine Gruppe von kongenitalen (neuro-)kutanen Erkrankungen verstanden, die aufgrund aktivierender Punktmutationen in Genen des RAS-MAPK-Signalweges entstehen (Luo & Tsao, 2014). Darunter fallen u.a. die oben beschriebenen Nävusentitäten, die Neurokutane Melanose, das Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndrom, die Enzephalokraniokutane Lipomatose sowie das Okuloektodermale Syndrom und arteriovenöse Malformationen. Im Gegensatz zu den Keimbahn-RASopathien, handelt es sich beim Mutationsspektrum der Mosaik-RASopathien um eines, das den onkogenen Mutationen in Tumoren entspricht, wie z.B. RAS-Mutationen der Aminosäurereste p.G12, p.G13, oder p.Q61 sowie der BRAF-Mutation p.V600E (Zenker & Kutsche, 2016). Dass diese Mutationen zwar als Mosaik aber nicht als Keimbahnmutation beobachtet werden, unterstreicht die Annahme, dass sie als Keimbahnmutation embryonal letal wären. Der Mutationsnachweis bei Mosaik-RASopathien gelingt in der Regel lediglich aus läsionalem Gewebe und kann nur in Ausnahmefällen an Leukozyten-DNA geführt werden.

1.4.4 Mutationsspektrum der kongenitalen melanozytären Nävi und der Neurokutanen Melanose

Bereits 2007 konnten *Bauer et. al* erstmals in CMN aktivierende NRAS-Mutationen (Bauer et al., 2007) detektieren. *Kinsler et. al* konnten 2013 bei Patienten mit multiplen CMN oder NCM bekannte onkogene NRAS-Mutationen an Codon 61 (c.181C>A p.Q61K und c.182A>G

p.Q61R) in läsionalem Gewebe, nicht aber in Leukozyten-DNA nachweisen und ordneten folglich CMN bzw. NCM erstmals den Mosaik-RASopathien zu (Kinsler et al., 2013). Auch Charbel et al. konnten die oben aufgeführten NRAS-Mutationen in LCMN und GCMN bestätigen (Charbel et al., 2014). Weitere NRAS-Mutationen (c.37G>C; p.G13R) wurden im Zusammenhang mit der NCM beschrieben (Shih et al., 2014). Eine Vielzahl von Autoren publizierten zudem die BRAF-Mutation c. 1799T>A, p.V600E als genetische Grundlage sowohl der CMN als auch der NCM (Charbel et al., 2014; Qi et al., 2011; Salgado et al., 2015; Wu et al., 2007). Somit stellen die NRAS-Mutationen (p.Q61K und p.Q61R) sowie die BRAF-Mutation (p.V600E) Hotspotmutationen in der Pathogenese der beiden Krankheitsbilder dar.

1.4.5 Mutationsspektrum der keratinozytären epidermalen Nävi (KEN)

Hafner et al. (2012) beschrieben erstmalig Mutationen aus dem RAS-MAPK-Signalweg als ursächlich für die Entstehung von KEN und bezeichneten diesen Teil der KEN als Mosaik-RASopathie. Hierbei handelte es sich um HRAS- (p.G12C; p.G13R p.Q61L; p.G12V), NRAS- (p.G12D; p.P34L; p.Q61R) und KRAS-Mutationen (p.G12D), wobei die HRAS-Mutation c.37G>C p.G13R einen Hotspot darstellte. Als weitere Mutationen, die nicht den RAS-MAPK-Signalweg angehören, wurden aktivierende FGFR3- und PIK3CA-Mutationen gefunden (Hafner et al., 2006, 2007). Durch Toll et al. konnte das Spektrum der Mutationen, die als genetische Grundlage der KEN gelten, um die FGFR2-Mutationen (c.1127A>G p.Y376C und c.755C> p.S252W) erweitert werden (Toll et al., 2016).

1.4.6 Mutationsspektrum des Naevus sebaceus, des Schimmelpenning-Syndroms und der Talgdrüsenhyperplasien

Die ersten Mutationsanalysen sowohl der Naevi sebacei als auch des SFM-Syndroms wurden 2012 durch Groesser et al. veröffentlicht. Die Wissenschaftler konnten aktivierende Mutationen im HRAS- als auch im KRAS-Gen als Ursache der Krankheitsbilder detektieren. Die HRAS-Mutation c.37G>C p.G13C stellte bei den Untersuchungen eine Hotspotmutation dar. Durch Untersuchungen an gesundem Gewebe, in dem die Mutationen nicht nachweisbar waren, konnte sowohl die Hypothese des kutanen Mosaiks, als auch der kausale Zusammenhang zwischen Mutation und resultierendem Phänotyp bestätigt werden (Groesser

et al., 2012). *Levinsohn et al.* und *Sun et al.* bestätigten mittels Exom-Sequenzierung als auch durch Sanger-Sequenzierung aktivierende Mutationen im HRAS- (p.G13R) sowie KRAS-Gen (P.G12D; p.G12V). Auch hier konnte in gesundem Gewebe keine der aufgeführten Mutationen gefunden werden und somit die Hypothese der Mosaik-RASopathie bestätigt werden. (Levinsohn et al., 2013; Sun et al., 2013). In keiner der drei Studien ließ sich bei diesen Krankheitsbildern eine NRAS-Mutation detektieren, so dass sich eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen den melanozytären und den epidermalen Nävi abzeichnete.

Aufgrund der ungeklärten Ursache der Entstehung und der histologischen Ähnlichkeit der Talgdrüsenhyperplasien zu den Naevi sebacei untersuchten *Groesser et al.* 2016 Proben mit SGH auf Mutationen in Genen des RAS-MAPK-Signalwegs und anderen Onkogenen. Dabei zeigten die Proben bekannte Hotspotmutationen im HRAS- und KRAS-Gen (vgl. Tabelle 1) als auch eine Mutation im EGFR-Gen (c.2573T>G, p. L858R). Mutationsanalysen an gesundem Gewebe zeigten einen Wildtyp, sodass darauf geschlossen werden kann, dass die aufgeführten somatischen Mutationen zur Entstehung der SGH führen (*Groesser et al.*, 2016).

1.4.7 Mutationsspektrum der Enzephalokraniokutanen Lipomatose

Die ersten Ergebnisse zur molekulargenetischen Grundlage der ECCL wurden 2016 veröffentlicht. *Bennett et. al* konnten bei Untersuchungen mittels Exom-Sequenzierung und Bestätigung per Sanger-Sequenzierung FGFR1-Mutationen (c.1638C>A p.N546K und c.1966A>G, p.K656E) als Ursache für die ECCL detektieren (*Bennett et al.*, 2016). Die rekurrente Mutation konnte auch hier nur in läsionalem Gewebe detektiert werden und war in Blut- bzw. Speichel-DNA nicht detektierbar. *Boppudi et al.* beschrieben zudem eine Mutation im KRAS-Gen (c.436G>A p.A146T), die als ursächlich für die Krankheit angesehen wurde (*Boppudi et al.*, 2016). Somit zählt auch die ECCL zum Spektrum der Mosaik-RASopathien.

1.4.8 Mutationsspektrum des Okuloektodermalen Syndroms

Peacock et al. beschrieben 2015 erstmals die genetische Ursache des OES. Bei Untersuchungen mittels vergleichender Genomsequenzierung zwischen DNA aus läsionalem Gewebe und Leukozyten-DNA konnten somatische Missense-Mutationen im KRAS-Gen (c.38G>A p.G13D und c.57G>C p.L19F) detektiert werden (Peacock et al., 2015). Diese konnten nur in läsionalem Gewebe nachgewiesen werden und der Anteil des mutierten Allels betrug jeweils unter 40%, sodass man davon ausging, dass das OES eine Mosaik-RASopathie ist. Diese These konnte durch das Institut für Humangenetik der Otto-von-Guericke Universität bestätigt werden. *Boppudi et al.* beschrieben 2016 weitere Patienten mit OES, dessen Entstehung auf Mutationen im KRAS-Gen (c.436G>A p.A146T und c.437C>T, p.A146Val) zurückzuführen war. Die Allel-Frequenz des mutierten Allels lag dabei in läsionalem Gewebe zwischen 10% und 40%. Im Gegensatz dazu konnten die Mutationen in Leukozyten-DNA nicht detektiert werden, was die Annahme eines somatischen Mosaiks und somit die Zugehörigkeit des OES zu den Mosaik-RASopathien bestärkt (Boppudi et al., 2016). *Chacon-Camacho et al.* konnten die KRAS-Mutationen (c.436G>A, p.Ala146Thr und c.437C>T, p.Ala146V) bei weiteren Fällen von OES bestätigen. Auch hier waren die Mutationen nur in den betroffenen Geweben und nicht in DNA von Leukozyten bzw. Mundschleimhaut nachweisbar (Chacon-Camacho et al., 2019).

Tabelle 1 zeigt zusammenfassend alle zu Beginn der Arbeiten an dieser Dissertation in der Literatur beschriebenen Mutationen, die als ursächlich für die oben aufgeführten Mosaik-RASopathien angesehen werden.

Tab. 1: Mutationsübersicht ausgewählter Mosaik-RASopathien

Entität	Gen	Mutationen	Referenzen	
Kongenitaler melanozytärer Nävus	NRAS	G61R	6, 13, 47	
		G61K		
	BRAF	V600E	13, 61, 69, 86	
Neurokutane Melanose	NRAS	G61R	47	
		G61K		
	BRAF	V600E	69	
Keratinozytärer epidermaler Nävus	HRAS	G13R	27	
		G12C		
		G12V		
		Q61L		
	NRAS	G12D		
		P34L		
		Q61R		
	KRAS	G12D		
	FGFR2	S252W		81
		Y376C		
FGFR3	R248C	26,27		
	G372C			
PIK3CA	E542K	27,29		
	E545G(K)			
	H1047R			
Naevus sebaceus	HRAS	G13R	21, 52,78	
		G12S	21	
		G12D		
		G12C		
	A11S			
	KRAS	G12D	21, 52,78	
G12V				
Schimmelpenning-Syndrom	HRAS	G13R	21	
	KRAS	G12D		
Talgdrüsenhyperplasien	HRAS	Q61R	22	
		Q61K		
		G12D		
		Q61L		
		G13R		
	KRAS	G12C		
		G12V		
G12D				
EGFR	L858R			
ECCL	KRAS	A146T	9	
	FGFR1	N546K	7	
K656E				
OES	KRAS	G13D	59	
		L19F		
		A146V	9,11	
		A146T		

1.5 Zielsetzung

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Entitäten kongenitaler Nävi systematisch zum Mutationsspektrum, zur Mutationsverteilung und zur Korrelation von Genotyp und Phänotyp zu untersuchen. Im Detail sollten dabei folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Lassen sich die bislang vorliegenden Ergebnisse der Mutationsanalysen melanozytärer und keratinozytärer Nävi sowie der Talgdrüsenhyperplasien an einem größeren Patientenkollektiv bestätigen?
- 2) Gibt es weitere/neue Mutationen in den bereits etablierten oder in anderen Genen des RAS-MAPK-Signalweges, die durch Einsatz hochsensitiver Nachweismethoden detektiert werden können?
- 3) Können bisher gezeigte Genotyp-Phänotyp-Korrelationen in Bezug auf die Nävusentitäten als auch die Nävusgröße bestätigt werden?
- 4) Welche Bedeutung kommt ggf. Doppelmutationen bei der Entstehung von kongenitalen Nävi und komplexen Mosaik-RASopathie-Syndromen zu?
- 5) Können durch Mutationsanalysen neue Erkenntnisse zur Tumorgenese von malignen Melanomen auf dem Boden kongenitaler Nävi gewonnen werden?

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Bei dem Studienmaterial handelte es sich um 97 anonymisierte Proben aus archiviertem pathologischen Restmaterial von CMN, EN, NS und SGH. Die Proben stammen aus dem Institut der Pathologie des Harzklinikum Quedlinburg sowie aus dem dermato-histologischen Labor Dr. Helmut Laaff in Freiburg i. Br. und lagen als Alkohol-fixiertes oder Formalin-fixiertes in Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe vor.

Durch die Anonymisierung der Patientendaten erhielten wir als klinische Informationen lediglich die dermato-histologische Diagnose des Nävus, den Exzisionsort und das Alter des Patienten zum Exzisionszeitpunkt.

Die DNA-Proben des komplexen RASopathie-Syndroms wurden aus nativem Gewebe oder kultivierten Zellen gewonnen und konnten aufgrund einer Kooperation mit Frau Prof. Tinschert untersucht werden und entstammen dem Probenarchiv der Charité Berlin.

Alle Patienten, beziehungsweise deren Eltern oder Sorgeberechtigte, hatten die Einwilligung zu wissenschaftlichen Untersuchungen an ihrem Material, sowie der Publikation der Ergebnisse zugestimmt.

Vor Beginn der Untersuchungen wurden sowohl von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Zeichen 112/16) als auch der Ethikkommission der Ärztekammer Sachsen-Anhalt jeweils ein positives Votum (Zeichen 56/16) eingeholt.

2.2 Auswahl der Sequenzierungsmethode

Die DNA-Proben der CMN wurden zunächst per PCR und Sanger-Sequenzierung auf die bekannten Hotspotmutationen im NRAS- als auch im BRAF-Gen untersucht. CMN, bei denen durch konventionelle Sequenzierung keine Mutation festgestellt werden konnte, unterzogen wir der Untersuchung eines Panels von Genen (Illumina TruSeq Custom Amplicon Panel) mithilfe der Next-Generation-Sequencing (NGS)- Technologie.

Die Mutationen der weiteren Nävus-Entitäten wurden aufgrund des breiteren Verteilungsmusters der Hotspotmutationen ausschließlich mithilfe der Panelsequenzierung detektiert.

2.3. Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

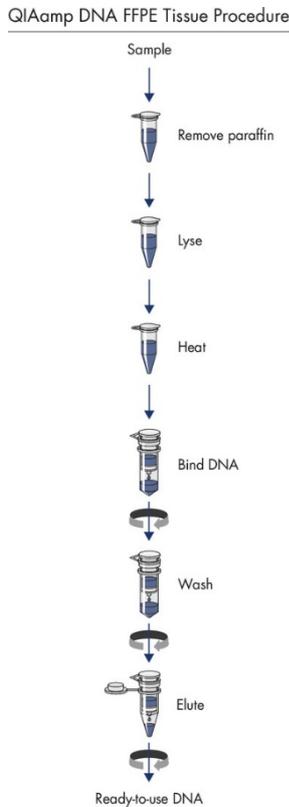


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aufreinigung der DNA

Die zu untersuchenden Proben lagen zunächst nur als fixierte Paraffin-Blöckchen vor. Zur Isolation der DNA wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums per Mikrotom 3-5 ca. 10µm dicke Schnitte der in Paraffin gebeteten Probe angefertigt werden. Mittels Skalpell wurde das Gewebe vom Paraffin getrennt und mithilfe des QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll, wie in Abbildung 2 gezeigt, DNA extrahiert (QIAGEN® (Hg.) (2020): *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*). Durch die Verwendung des Kits werden Cross-Links der DNA, die durch die Formalinfixierung entstanden sind, reduziert und somit bessere Amplifikations-Ergebnisse in der nachfolgenden PCR erzielt.

Nach der Isolation erfolgte die Konzentrationsmessung der DNA mittels NanoDrop Spektralphotometer (Thermo Fisher; Waltham, MA, USA). Dabei werden 1-2µl der extrahierten DNA auf das Gerät gegeben. Dieses misst die Extinktion der Probe bei drei verschiedenen Wellenlängen. Unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann der Computer die DNA-Konzentration der Probe berechnen und über die Verhältnisse der Extinktionsparameter auch die Reinheit bestimmen. (Thermo Fischer Scientific).

2.3.2 Amplifikation der DNA mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction), 1983 von Kary Mullis entwickelt, dient zur Amplifikation eines kurzen DNA-Abschnittes einer Zielsequenz und ist eine der wichtigsten Methoden der Molekulargenetik. Notwendig dafür sind spezifische Oligonukleotid-Primer, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase, der sogenannten Taq-Polymerase, und unter Verwendung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's) kann der zu amplifizierende DNA-Abschnitt für weitere Untersuchungsschritte vervielfältigt werden. Die dNTP-Lösung enthält dabei die Nukleosidtriphosphate der DNA-Basen Adenosin, Cytosin, Guanosin und Thymin. Die weiteren Reagenzien werden zur Pufferung der Reaktionslösung und zur Stabilisierung sowohl der DNA-Polymerase als auch der Primer benötigt. Tabelle 2 zeigt das für die Versuche verwendete Standardprotokoll des Instituts für Humangenetik.

Die PCR verläuft in drei Schritten. Bei der *Denaturierung* wird die doppelsträngige DNA-Helix aufgetrennt und es entstehen DNA-Einzelstränge. Das *Annealing* beschreibt die Anlagerung der Primer an den komplementären DNA-Einzelstrang. Abgeschlossen wird die PCR durch die *Elongation* bei der die Taq-Polymerase beginnend am Primer den komplementären Strang des DNA-Einzelstranges synthetisiert. Bei jedem dieser dreiphasigen Zyklen wird die DNA-Menge verdoppelt. Dadurch wird eine exponentielle Vervielfältigung des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes erreicht. Die abschließende Elongation vervollständigt vorzeitig abgebrochene Syntheseprodukte.

Zur Vermeidung der Vervielfältigung von unerwünschten Nebenprodukten wurde ein Touchdown-Protokoll gewählt. Hierbei wird die Temperatur während des Annealings der ersten 10 Zyklen alle 2 Zyklen um 2°C von 65°C bis auf 55°C gesenkt. Dies hat zur Folge, dass in den ersten Syntheseyklen die Spezifität der Primerbindung erhöht ist und somit weniger Amplikons unspezifischer DNA-Sequenzen entstehen. Tabelle 3 zeigt das genaue Reaktionsprotokoll der für die Dissertation verwendeten PCR.

Die für die Experimente genutzten Primer sowie deren zugehörige Referenzsequenzen zeigt Tabelle 4.

Tab. 2: Reaktionsansatz der PCR

Reagenzien	Volumen	Reagenzien	Volumen
DNA (50 ng/ μ l)	0,7 μ l	MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μ l
ddH ₂ O	5,6 μ l	DMSO (5 %)	1 μ l
Puffer	2 μ l	Betain (5 M)	4 μ l
dNTPs (2 mM)	2 μ l	Platinum-Taq (5 U/ μ l)	0,1 μ l
FP (2,5 pmol/ μ l)	2 μ l	DNA	0,7 μ l
RP (2,5 pmol/ μ l)	2 μ l		

FP, Forward Primer; RP, reverser Primer

Tab. 3: Reaktionsprotokoll der PCR

Reaktionsschritt	Protokoll
Initiale Denaturierung	94°C, 5 min
Amplifikation	41 Zyklen <i>Denaturierung</i> 94°C, 30 sec <i>Annealing</i> 65°C, 45 sec für 2 Zyklen 63°C, 45 sec für 2 Zyklen 61°C, 45 sec für 2 Zyklen 59°C, 45 sec für 2 Zyklen 57°C, 45 sec für 2 Zyklen 55°C, 45 sec für 31 Zyklen <i>Elongation</i> 72°C, 45 sec
Abschließende Elongation	72°C, 10 min
Abkühlen	4°C, unendlich

Tab. 4: Primer und Referenzsequenzen

Exon	MIM-Nummer	Size (bp)	Primer forward	Primer reverse	PCR-Product (bp)	Referenzsequenzen	e-PCR* detektierte Mutation
GNAQ_E04_2	600998	129	tccttccttccgtagaca	gttactacCTGAAAATGACA CTTTGT	209	ENST000002 86548.8	√ R183Q
NRAS_E02	164790	128	ggttccaacagGTTCT TGC	cactgggcctcacCTCTATG	153	ENST000003 69535	√ G13S/D, G12, A18T
NRAS_E03	164790	179	ACAAGTGGTTAT AGATGGTGAAA CC	TCCGCAAATGACTTGCT ATT	150	ENST000003 69535	√ Q61R/K
BRAF_E15	164757	119	tgcttgctctgataggaaaa tg	agcctcaattcttacCATCCA	191	ENST000002 88602	√ V600E
KRAS_E02	190070	122	GCCTGCTGAAA ATGACTGAA	agaatggtcctgcaccagtaa	167	ENST000003 11936	√ G12D/V/A
HRAS_E02	190020	164	CAGGAGACCCT GTAGGAGGA	agctgctggcacctggac	193	ENST000004 51590	√ G13/S/C
HRAS_E03	190020	179	agaggctggctgtgtgaac t	TGGTGGATGTCCTCAAA AGA	242	ENST000004 51590	√ Q61R/K, T58I
RHOA_E02	165390	158	GATGGAGCCTGT GGAAAGAC	tgctccataaatattctaacatgga	179	ENST000004 18115.6	√ E47K

* , überprüft mit In-Silico PCR (UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>)

2.3.3 Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese kann die Entstehung und Reinheit der PCR-Produkte überprüft werden. Durch Anlegen einer Spannung wandern die DNA-Stränge, die durch die enthaltene Phosphatgruppen negativ geladen sind, in Richtung der Anode. Dabei werden sie in der Gelmatrix anhand ihrer Basenpaarlänge aufgetrennt. Wurde die PCR korrekt durchgeführt, entsteht eine scharf begrenzte Bande. Mithilfe der Referenzwerte des Längenstandards (Fermentas 100 bp DNA ladder; Invitrogen, Varlsbad, CA, USA), der aus 15 Fragmenten zwischen 100 und 1500 bp besteht, kann die Länge des PCR-Produktes bestimmt werden. Doppelte, unscharfe oder fehlende Banden sprechen für eine unsauber abgelaufene PCR bzw. eine unspezifische Amplifikation der DNA.

Die DNA-Proben wurden zusammen mit dem Ladepuffer in die Ladekammern eines 2% Agarosegels aufgetragen. Dieses wurde aus 4g Agarose, 40ml 5x TBE-Puffer, 160ml destilliertem Wasser unter Wärmezufuhr hergestellt und nach Abkühlung auf etwa 50°C unter dem Abzug mit 20µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Ethidiumbromid, ein Phenantridin-Farbstoff, interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und dient dabei zur Visualisierung der PCR-Produkte unter UV-Licht. Dabei wird das Anregungsspektrum des Ethidiumbromid

verändert, wodurch die Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht stark erhöht wird. Somit kann die Lage der PCR-Produkte im Gel unter Bestrahlung mit UV-Licht, als leuchtende Bande dargestellt werden. Die Gelbilder wurden mit der DeVision DBOX mit UV Transiluminator aufgenommen. Abbildung 3 zeigt eine Aufnahme einer Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten des Exon 15 des BRAF-Gens.

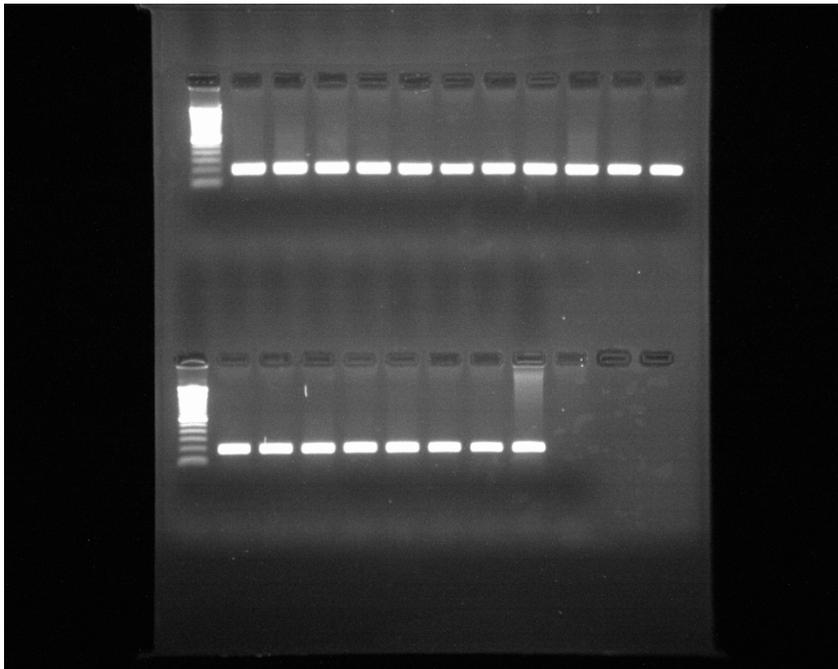


Abb. 3: Gelelektrophorese von PCR-Produkten des Exon 15 des BRAF-Gens
In den beiden linken Spuren sind die Längenstandards aufgetragen. Die BRAF-PCR-Produkte unabhängiger Proben betragen 191bp und sind in den Spuren rechts der DNA-Längenstandards aufgetragen.

2.3.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte bestmöglich sequenzieren zu können, müssen die restlichen Bestandteile des Reaktionsansatzes entfernt werden. Mithilfe der Agencourt AMPure XP-Methode können die Kontaminanten (Primer, Primerdimere, Salze und NTP's) entfernt werden. Die einzelnen Schritte werden hierbei von einem Pipettier-Roboter (Biomek NXp Laboratory Automation Workstation/Beckman Coulter; Brea, CA, USA) automatisch durchgeführt.

Abbildung 4 zeigt das Verfahren zur Aufreinigung der PCR-Produkte. Pro 1µl PCR-Produkt werden im ersten Schritt (1) 1,8 µl AMPure XP hinzugefügt. In der Folge binden die paramagnetischen Beads an die DNA-Fragmente (2) und werden dann mittels Magnet von den Kontaminanten separiert (3). Durch die zweimalige Aufreinigung des Beads-DNA-Komplexes mit 70% Ethanol werden weitere Kontaminanten entfernt (4). Mithilfe von destilliertem Wasser

werden die PCR-Produkte von den Beads eluiert (5) und in eine neue Reaktionsplatte überführt (Agencourt Bioscience Corp (Hg.) (2013): *AGENCOURT® AMPURE® XP. PCR Purification.*).

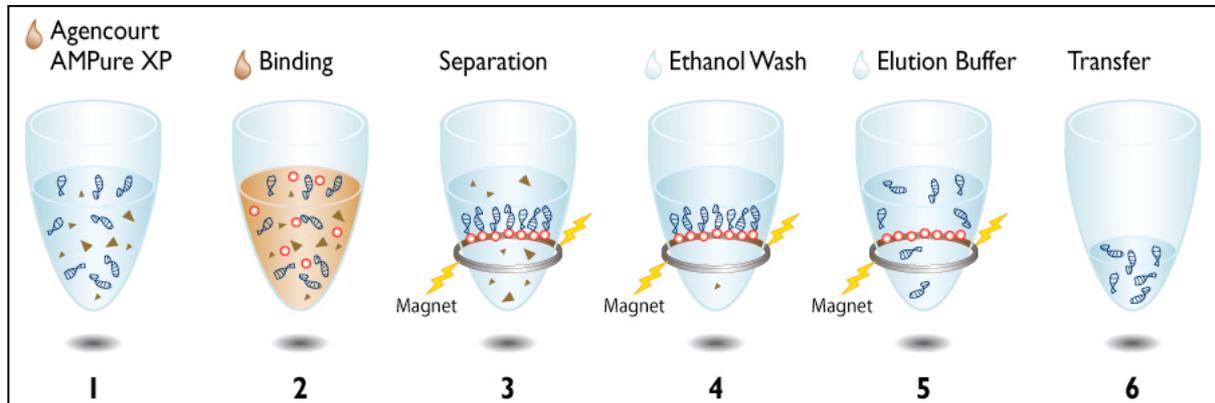


Abb. 4: Aufreinigung des PCR-Produkts laut Protokoll des Herstellers (Agencourt Bioscience Corporation, 2013)

2.3.6 Sequenzierung nach der Sanger-Methode

Um die Basenabfolge der DNA-Sequenzen analysieren zu können, wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Es arbeitet nach einer weiterentwickelten Methode des Kettenabbruch- und Didesoxynucleotidverfahrens (Sanger et al., 1977) und wird im Folgenden als Sanger-Sequenzierung benannt.

Bei der Sequenzierung wird die doppelsträngige DNA denaturiert und mithilfe einer Polymerase, Nukleotiden und einem Primer ein neuer komplementärer DNA-Strang gebildet. Im Gegensatz zur PCR wird bei der Sequenzierung also der neue DNA-Strang nur unidirektional synthetisiert. Es werden zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonucleosidtriphosphat (ddNTP's) verwendet, wobei die vier Nukleotide jeweils einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Sie besitzen am 3'-C-Atom keine Hydroxylgruppe und können somit keine Phosphodiesterbindung zu einem weiteren dNTP bilden. Der Einbau eines ddNTP führt somit zum Syntheseabbruch des komplementären DNA-Stranges. Für die Versuche wurde ein Fast-Cycler (Veriti 96 well Fast Thermal Cycler / Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) und die in Tabelle 5 und 6 dargestellten Standardprotokolle des Instituts für Humangenetik verwendet.

Tab. 5: Reaktionsansatz der Sequenzierung

Reagenzien	Volumen
H ₂ O	2,65 µl
Puffer	1,0 µl
BigDye	0,25 µl
Volumen	3,9 µl

Tab. 6: Reaktionsprotokoll der Sequenzierung

Reaktionsschritt	Protokoll
Amplifikation	26 Zyklen <i>Denaturierung</i> 98°C, 10 sec <i>Annealing</i> 55°C, 10 sec <i>Elongation</i> 60°C, 60 sec
Abkühlen	10°C, unendlich

2.3.6 Aufreinigung und Auswertung der Sequenzierung

Ähnlich wie bei der PCR müssen auch nach der Sequenzierung die Produkte von den restlichen Bestandteilen des Reaktionsansatzes entfernt und aufgereinigt werden. Hierzu wird das gleiche Prinzip wie bei der Aufreinigung der PCR-Produkte verwandt. Mittels paramagnetischer Beads wurden die DNA-Abschnitte gebunden und die Kontaminanten abpipettiert. Im letzten Schritt konnte dann die DNA von den Beads eluiert werden. Abbildung 5 zeigt schematisch die Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte nach der Agencourt CleanSEQ-Methode (Agencourt Bioscience Corp (Hg.) (2017): *AGENCOURT® CLEANSEQ®. Dye-Terminator Removal.*). Die einzelnen Schritte wurde ebenfalls durch den Pipettierroboter durchgeführt.

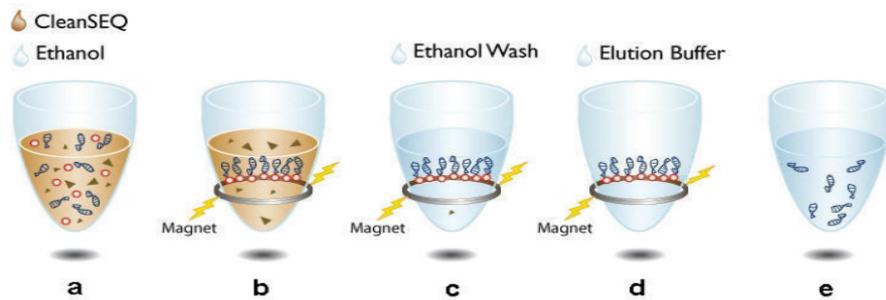


Abb. 5: Aufreinigung des Sequenzierungsprodukts laut Protokoll des Herstellers Agencourt Bioscience Corporation, 2017)

Mittels Sequenzierautomaten ABI3500XL capillary sequencer von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) wurden die Sequenzierungsprodukte ausgewertet. Dabei werden die Sequenzierungsprodukte per Kapillarelektrophorese nach ihrer Fragmentlänge aufgetrennt. Durch den Einbau der ddNTP's und dem daraus resultierenden Syntheseabbruch entstanden unterschiedlich lange Fragmente mit spezifischer Fluoreszenzmarkierung. Diese wurden im Sequenzierautomaten mittels Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt und an einem Detektor vorbeigeführt. Durch das entstehende Elektropherogramm kann die Basenabfolge der DNA-Stränge im Gemenge (Batch) identifiziert werden.

Für die Auswertung des Elektropherogramms wurde das Softwafreprogramm SeqPilot der JSI medical systems GmbH (Ettenheim, Deutschland) angewandt. Ein Mutations-Mosaik stellte sich als zweiter Peak im Elektropherogramm dar bzw. konnte mathematisch als zweite „result peak area“ in der statistischen Auswertung des SeqPilot (SeqPilot module SeqPatient, Version 4.3.0) erkannt werden. Der Anteil des mutierten Allels im Mosaik wurde errechnet als Quotient der mutierten „result peak area“ M und der Summe aus mutierter und wildtyp W „result peak area“ ($M:M+W$).

2.3.7 NGS-basierte Panel-Sequenzierung

2.3.7.1 Messung der DNA-Konzentration

Aufgrund niedriger DNA-Konzentrationen ergänzten wir die spektral-photometrische Konzentrationsmessung der DNA um die sensitivere Messung mittels Qubit Flurometer (Thermo Fisher Scientific). Dabei binden fluoreszierende Farbstoffe direkt an das zu untersuchende Molekül, in unserem Fall die DNA. Der Fluoreszenzfarbstoff sendet nur im DNA-gebundenen Zustand Signale aus, wodurch eine genaue Messung der DNA-Konzentration möglich wird.

2.3.7.2 Bestimmung der DNA-Konzentration mit Hilfe der Real-Time quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, die auf den herkömmlichen Grundlagen einer PCR beruht, gleichzeitig aber noch die Quantifizierung des DNA-Produktes ermöglicht.

Die qPCR wurde mittels „Illumina FFPE QC Kit for TruSeq Amplicon-Cancer Panel and TruSeq Custom Amplicon“ durchgeführt, um eine präzise Quantifizierung auch geringer DNA-Mengen und damit eine erfolgreiche Analyse der FFPE-DNA mittels Panel-Diagnostik prognostizieren zu können.

2.3.7.3 Next-Generation Sequenzierung

Die „Next-Generation Sequenzierung“ ist eine Methode der massiven parallelen Sequenzierung von vorzugsweise fragmentierten DNA-Einzelmolekülen

und setzt sich grundlegend aus den folgenden Schritten zusammen:

1. Erstellung einer Sequenzierbibliothek
2. Amplifikation
3. Sequenzierung und Signaldetektion
4. Bioinformatische Aufarbeitung der Rohdaten
5. Auswertung

Die Proben wurden für die Arbeit nach Amplikon-basierter Anreicherung sequenziert. Zur Anreicherung wurde das Illumina TruSeq Custom Amplicon Panel verwendet. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina® MiSeq™-System. Aufgrund der geringen DNA-Mengen sowie -qualität der Proben und des hohen monetären Einsatzes für die Panelsequenzierung wurden die Untersuchungen durch die MTA's des Instituts gemäß den Anleitungen des Herstellers und interner Protokolle durchgeführt.

Die durchschnittliche Sequenziertiefe der einzelnen Gene lag zwischen 648 und 13243 Total Reads (Mittelwert 5179 Reads). Die deutliche Streuung ist aufgrund der teilweise geringen DNA-Mengen und -qualität aus archivarischem FFPE-Material zu erklären. So konnte in einigen Fällen nicht die gewünschte Lesetiefe von >1000-fach erreicht werden.

Die mittels Amplikon-basierter NGS untersuchten Gene zeigte Tabelle 7 in der Appendix der Arbeit.

2.3.7.4 Datenanalyse der Panel-Diagnostik

Die Rohdaten der NGS-basierten Panel-Diagnostik wurden in das Software-Programm Variant Studio Data Analysis 3.0 von Illumina eingepflegt.

Alle Ergebnisse wurden auf ihre Beschreibung in der COSMIC-Datenbank und dbSNP/ClinVar überprüft und mit den folgenden drei Filtern weiter eingeteilt:

- (1) Variant Allele Frequency (VAF) über Artefaktschwelle
- (2) >40 Einträge in der COSMIC-Datenbank
- (3) Einstufung als „pathogenic“ in der ClinVar-Datenbank

Die aus dem archivarischen FFPE-Material extrahierte DNA erwies sich in ihrer Qualität und Quantität als sehr heterogen, so dass die verwendete NGS-basierte ultratiefe Sequenzierungsmethode, die bei guter DNA-Qualität eine Detektionsschwelle für Mosaik-Varianten bei etwa 1% erreicht (interne Validierungsdaten) in diesem Projekt probenabhängig zum Teil deutlich geringere Lesetiefen erreichte und eine erhöhte Rate von Artefakten (vermutlich PCR-Artefakte) zeigte. Dies sind grundsätzlich bekannte Phänomene, dass mit abnehmender Menge und Qualität der DNA-Templates stärkere Amplifikationsartefakte zum Tragen kommen. Um diesem individuellen probenabhängigen Störfaktor zu begegnen, wurde ein probenspezifischer Qualitätsscore entwickelt, um die Artefaktschwelle zu determinieren.

Hierzu wurde für jede Probe die Anzahl der detektierten „Mosaik“-Varianten bei den VAF von 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% ermittelt. Der Qualitätsscore beruhte dabei auf der Annahme, dass das häufige Auftreten von Varianten, besonders im Bereich der höheren VAF, überwiegend durch PCR-Artefakte bzw. klonale Effekte entsteht. Lediglich Varianten, die in einem VAF-Bereich lagen, dessen Variantenanzahl ≤ 2 in dieser Probe war, erfüllten unseren Qualitätsscore und wurden als „über der probenspezifischen Artefaktschwelle“ liegend angesehen.

Mithilfe der unter (1) – (3) aufgeführten Filterkriterien wurden die Mutationsvarianten in folgende Klassen eingeteilt:

Klasse 1: Proben mit bekannter pathogener Mutation für die spezifische Entität und einer VAF über der Artefaktschwelle bzw. Reevaluation und Detektion mittels Sanger-Sequenzierung.

Klasse 2: Proben mit wahrscheinlich kausaler Bedeutung für die untersuchte Läsion

- 2a: Bekannte pathogene Variante für die spezifische Entität, die aber nicht über der Artefaktschwelle der VAF liegt.
- 2b: Unbekannte Variante in einem Gen, das bereits einen etablierten Kausalzusammenhang mit der spezifischen Entität hat und über der Artefaktschwelle der VAF liegt. Die Probe würde somit eine Erweiterung des Mutationsspektrums darstellen.
- 2c: Unbekannte Variante in einem Gen, das bereits einen etablierten Kausalzusammenhang mit der spezifischen Entität hat, die aber nicht über der Artefaktschwelle der VAF liegt.

Klasse 3: Proben mit möglicher kausaler Bedeutung für die Läsion:

- 3a: Bekannte pathogene Variante in einem Gen, das noch keinen etablierten Zusammenhang zur Entität hat, aber zum Pathway gehört, und über der Artefaktschwelle der VAF liegt.
- 3b: Bekannte pathogene Variante in einem Gen, das noch keinen etablierten Zusammenhang zur Entität hat, aber zum Pathway gehört, aber nicht über der Artefaktschwelle der VAF liegt.
- 3c: Bekannte pathogene Variante in einem Gen, das noch keinen etablierten Zusammenhang zur Entität hat, nicht zum Pathway gehört und über der Artefaktschwelle der VAF liegt.

- 3d: Bekannte pathogene Variante in einem Gen, das noch keinen etablierten Zusammenhang zur Entität hat und nicht zum Pathway gehört, aber nicht überhalb der Artefaktschwelle der VAF liegt.

Klasse 4: Negative Befunde und Befunde, die sich weder als bekannte pathogene Variante noch als mögliche Kandidatenvariante definieren lassen.

2.4 Materialien

2.4.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Agencourt CleanSEQ	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Betaine 5M	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
DMSO 5 %	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA
dNTP Set 100 mM	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
EDTA Disodium Salt Dihydrate	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 100 %	Zentralapotheke Universitätsklinik Magdeburg, Deutschland
Ethidium bromide	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Fermentas 100 bp DNA ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Illumina FFPE QC Kit for TruSeq Amplicon	Illumina, San Diego, CA, USA
Illumina TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit	Illumina, San Diego, CA, USA
Orange G	Chemapol, Prag, Tschechische Republik
<i>Taq</i> DNA Polymerase Recombinant (Kit mit <i>Taq</i> DNA Polymerase, Rxn Puffer und MgCl ₂ 50 mmol)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>Taq</i> Platinum DNA Polymerase Recombinant	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qubit® Working Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.4.2 Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
dNTP mix (2 mM) (5 ml)	Jeweils 100 µl 100 nM dCTP, dGTP, dTTP und dATP
Ladepuffer für Agarosegel (50 ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 7,5 g Ficoll 400 - 1ml EDTA - Auf 50 ml mit aufgereinigtem Wasser auffüllen - Mixen und etwas Orange G zufügen - 5 min zentrifugieren bei 3000 rpm und Überstand verwenden
TBE Puffer (1l)	<ul style="list-style-type: none"> - 54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan - 27,5 g Borsäure - 20 ml EDTA (0,5 M)

2.4.3 Geräte

Name	Hersteller
8-Kanal-Pipette m10 0,5-10 µl	Biohit, Helsinki, Finnland
96 Multiply PCR plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96 well Multiply Fast-PCR plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
ABI3500XL capillary sequencer	Applied Biosystems
Biomek NXp Laboratory Automation Workstation	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Combitips plus 0,1 ml und 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DeVision DBOX mit UV Transluminator	Decon ScienceTec, Hohengandern, Deutschland
Heraeus Labofuge 400	Thermo Scientific
MiSeq System	Illumina
MicroAmp Optical 96 well-reaction plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Milli Q Reference Ultrapure Water Purification System	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
miniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Multipette stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR SoftTubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
PerfectBlue Gelsystem Mini L	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
PerfectBlue Gelsystem Mini S	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PIPETMAN 0,2-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
Quibit Flurometer	Thermo Fisher Scientific
Thermowell Sealing Mat 96 well	Corning Inc., Corning, NY, USA
Veriti 96 well Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Vortex Genie	Scientific Industries, New York City, NY, USA
VWR DUO cycler	VWR, Radnor, PA, USA

2.4.4 Software, Online-Datenbanken und -Prädiktionsprogramme

ClinVar-Datenbank	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
COSMIC	https://cancer.sanger.ac.uk/COSMIC
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
SeqPilot	JSI medical systems
Variant Studio Data Analysis 3.0	Illumina

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung des PCR-Protokolls und Testung der Oligonukleotid-Primer für den Einsatz in der Sanger-Sequenzierung

Zur Prüfung der Primer und Festlegung eines standardisierten Versuchsablauf wurden zunächst vorhandene DNA-Proben melanozytärer Nävi des Instituts für Humangenetik genutzt. Die Kontrolle der erfolgreichen Durchführung der PCR erfolgt mittels Gelelektrophorese. Dabei sprach eine kräftige, klar abgrenzbare Bande für ein sauberes und ausreichendes PCR-Produkt, das für die Sanger-Sequenzierung geeignet ist. Durch den mitgeführten DNA-Längenstandard konnte die Länge des PCR-Produkts geschätzt werden und mit der zu erwartenden Länge verglichen werden. Die Abbildung 6 zeigt beispielhaft eine Gelelektrophorese mit PCR-Produkten des NRAS Exon 3. Unterschiede in den Intensitäten der Banden erklären sich aus den unterschiedlichen Konzentrationen der PCR-Produkte.

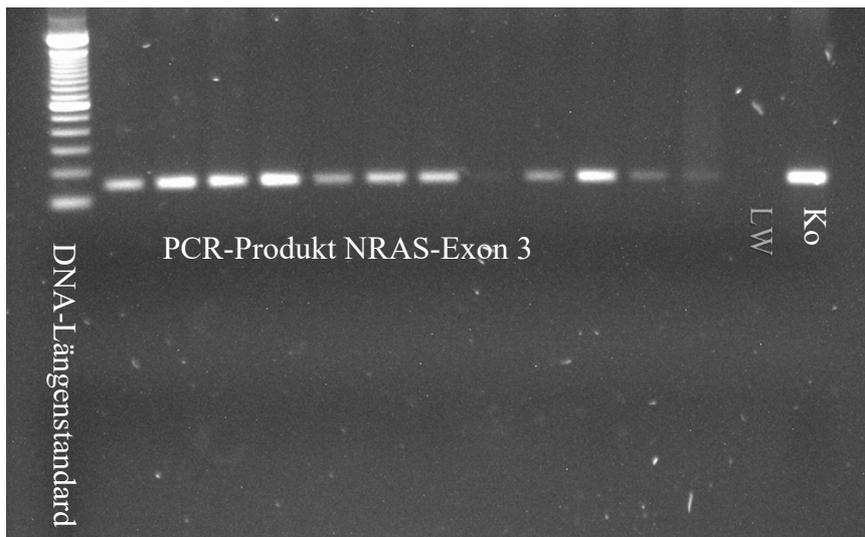


Abb. 6: Gelelektrophorese von PCR-Produkten des NRAS Exon 3. Die NRAS-PCR-Produkte unabhängiger Proben betragen 150bp. DNA-Längenstandard, Leerwert (LW) und Kontroll-DNA (Ko)

3.2 Ergebnisse der Mutationsanalyse bei CMN

3.2.1 Ergebnisse bei CMN mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung

Von den 67 untersuchten CMN-Proben konnten in 55 durch Sanger-Sequenzierung eine der bekannten Hotspotmutation identifiziert werden. Dabei zeigten 19 Proben (28,4%) eine der rekurrenten NRAS-Hotspotmutationen (c.181C>A p.Q61K oder c.182A>G p.Q61R) in Mosaik zu unterschiedlichen Anteilen. Wie unter 2.2.6 beschrieben konnte ein Mosaik als zweiter Peak im Elektropherogramm bzw. durch den Vergleich der „result peak areas“ detektiert werden. Abbildung 7 zeigt hierbei exemplarisch ein Elektropherogramm der NRAS-Mutation c.181C>A p. Q61K.

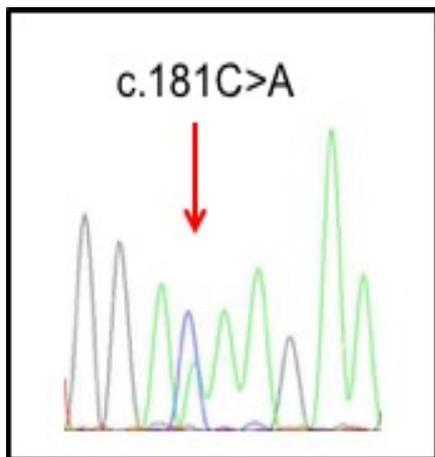


Abb. 7: Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms mit Nachweis einer Mosaik-Mutation in NRAS c.181C>A p. Q61K. Der Mutations-Peak (grün, A) ist deutlich niedriger als derjenige für den Wildtyp (blau, C).

Die kalkulierte *Variant Allele Frequency* (VAF) der Proben schwankte zwischen 11% und 37%. Diese wurde wie unter 2.2.6 beschreiben als Quotient aus der „result peak area“ des mutierten Allels und der Summe der „result peak areas“ des mutierten und des Wildtyp-Allels errechnet. Das mittlere Alter der Patienten bei der Exzision betrug in dieser Kohorte 28,5 Jahre. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 8 aufgelistet.

Der größere Teil der Proben (N=36, 53,7%) wies die bekannte BRAF-Mutation (c.1799T>A p.V600E) auf. Die dabei detektierten mutierten Allelfrequenzen betragen zwischen 12% und

45%. Das mittlere Patientenalter zum Zeitpunkt der Exzision betrug in dieser Kohorte 29,5 Jahre. Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der BRAF-Mutationsanalyse.

Tabelle 8: CMN mit gesicherter NRAS-Mutation

Proben-Nr.	Lokalisation	Alter	Diagnose	Mutation	VAF
16M2504	Unterschenkel	28	CMN (compound Typ)	c.181C>A p.Q61K	11%
16M2506	Oberschenkel	38	CMN (compound Typ)	c.181C>A p.Q61K	20%
16M2670	Oberarm	38	CMN (compound Typ)	c.181C>A p.Q61K	14%
16M2677	Wange	16	CMN (compound Typ)	c.182A>G p.Q61R	19%
16M2681	Unterschenkel	34	CMN (dermaler Typ)	c.182A>G p.Q61R	11%
16M2695	Schamlippe	14	CMN (compound Typ)	c.182A>G p.Q61R	16%
16M2699	Oberschenkel	23	CMN (compound Typ)	c.182A>G p.Q61R	17%
16M2703	Oberschenkel	65	CMN (dermaler Typ)	c.181C>A p.Q61K	14%
17M0545	Keine Angabe	18	CMN (compound Typ)	c.182A>G p.Q61R	27%
17M0569	Keine Angabe	35	CMN (compound Typ)	c.182A>G p.Q61R	16%
17M0573	Brustwirbelsäule	49	CMN (dermaler Typ)	c.182A>G p.Q61R	25%
17M1164	Nuchal	26	CMN (compound Typ)	c.182A>G p.Q61R	34%
17M1176	Rückenmitte	33	CMN (compound Typ)	c.182A>G p.Q61R	25%
16M1389	keine Angabe	9	CMN (compound Typ)	c.181C>A p.Q61K	37%
16M1394	Nacken	2	CMN (compound Typ)	c.181C>A p.Q61K	33%
16M2701	Interskapulär	68	CMN (compound Typ)	c.181C>A p.Q61K	31%
16M1683	Augenbraue	n.b.	CMN	c.181C>A, p.Q61K	25%
16M1705	Augenbraue	n.b.	CMN	c.181C>A p.Q61K	15%
16M1707	Unterarm	n.b.	CMN	c.181C>A p.Q61K	19%

n.a.= nicht bekannt

Tabelle 9: CMN mit gesicherter BRAF-Mutation

Proben-Nr.	Lokalisation	Alter	Diagnose	Mutation	VAF
16M2503	Schamlippe	19	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	26%
16M2505	Lumbal	20	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	31%
16M2667	Gluteal	20	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	39%
16M2672	Kniekehle	22	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	32%
16M2508	Brustwirbelsäule	19	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	24%
16M2675	Schamlippe	39	CMN (dermaler Typ)	c.1799T>A p.V600E	41%
16M2679	Hals	19	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	36%
16M2683	Retroaurikulär	19	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	12%
16M2685	Bauch	38	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	13%
16M2687	Schulter	33	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	21%
16M2689	Oberschenkel	38	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	32%
16M2691	Lendenwirbelsäule	24	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	34%
16M2693	Lendenwirbelsäule	40	CMN (dermaler Typ)	c.1799T>A p.V600E	39%
16M2697	Rückenmitte	58	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	29%
17M0543	Brust	36	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	15%

17M0548	Oberschenkel	37	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	30%
17M0551	Brustwirbelsäule	24	CMN (compound Typ)	c.1799T>A, p.V600E	16%
17M0553	Scapula	13	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	45%
17M0557	Rücken	32	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	23%
17M0559	Hüfte	37	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	40%
17M0565	Keine Angabe	52	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	36%
17M0571	Schulter	31	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	15%
17M0575	Nacken	38	CMN (dermaler Typ)	c.1799T>A p.V600E	18%
17M0577	Oberbauch	41	CMN (compound Typ)	c.1799T>A, p.V600E	17%
17M1160	Schulter	49	CMN (compound Typ)	c.1799T>A, p.V600E	19%
17M1162	Rücken	26	CMN (dermaler Typ)	c.1799T>A p.V600E	16%
17M1166	Oberarm	31	CMN (dermaler Typ)	c.1799T>A p.V600E	38%
17M1170	Oberarm	27	CMN (dermaler Typ)	c.1799T>A p.V600E	19%
17M1172	Schamhügel	31	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	25%
17M1178	Rücken	32	CMN (compound Typ)	c.1799T>A p.V600E	22%
16M1706	Unterschenkel	n.b.	CMN	c.1799T>A p.V600E	35%
16M1710	Leiste	n.b.	CMN	c.1799T>A p.V600E	45%
16M1805	Flanke	n.b.	CMN	c.1799T>A p.V600E	42%
16M1808	Okzipital	n.b.	CMN	c.1799T>A p.V600E	28%
16M1809	Handrücken	n.b.	CMN	c.1799T>A p.V600E	41%
16M1810	keine Angabe	n.b.	CMN	c.1799T>A p.V600E	18%

n.b.= nicht bekannt

3.2.2 NGS-basierte Panelsequenzierung melanozytärer Nävi

Die 12 verbliebenen Proben, die per Sanger-Sequenzierung keiner der bekannten Hotspotmutationen im NRAS- bzw. BRAF-Gen zugeordnet werden konnten, wurden mittels Illumina TruSeq Custom Amplicon Anreicherung und ultratiefer NGS-Sequenzierung weiter untersucht. Die Sequenzierdaten der Proben wurden nach dem im Kapitel 2.3.7.4 beschriebenen Workflow analysiert und dann den einzelnen Gruppen zugeteilt.

Dabei zeigten 3 weitere Proben die bekannten Mutationen im NRAS- bzw. BRAF-Gen. Hierbei lag die VAF aber nicht über für die individuelle Probe determinierten Artefaktschwelle und waren somit der Klasse 2a gemäß der in 2.3.7.4. beschriebenen Klassifikation zuzuordnen. Die Ergebnisse fasst Tabelle 10 zusammen.

Tabelle 10: CMN mit Varianten der Detektionsklasse 2a

Proben-Nr.	Lokalisation	Alter	Diagnose	Gen	Mutation	Total Reads	VAF
17M0555	Interskapulär	46	CMN (compound Typ)	NRAS	c.182A>G p.Q61R	1541	5%
17M0561	Bauch	36	CMN (compound Typ)	BRAF	c.1799T>A p.V600E	10205	6%
17M0563	Schulter	43	CMN (compound Typ)	BRAF	c.1799T>A p.V600E	7580	3%

Weiterhin konnten eine Mutationen oberhalb der Artefaktschwelle detektiert werden, die bisher nicht in CMN bekannt war und deren Gen nicht zum RAS-MAPK-Signalweg gehören. Dabei handelte es sich zum einen um eine Variante im RHOA-Gen c.139G>A p.E47K. Die Mutationen ist der Gruppe 3c zuzuordnen und in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: CMN mit Varianten der Detektionsklasse 3c

Proben-Nr.	Lokalisation	Alter	Diagnose	Gen	Mutation	Total Reads	VAF
16M2669	Schulterblatt	51	CMN (compound Typ)	RHOA	c.139G>A p. E47K	1406	37%

Drei weitere Proben zeigten multiple Varianten, die als ursächliche- oder Kandidatenmutation angesehen werden könnten und die nach dem in 2.3.7.4. beschriebenen Schema klassifiziert wurden. Diese sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: CMN mit multiplen Kandidatentypenvarianten

Proben-Nr.	Lokalisation	Alter	Diagnose	Gen	Mutation	Total Reads	VAF	Klasse
17M0549	Oberschenkel	48	CMN (compound Typ)	PIK3CA	c.323G>A p.R108H	5392	6%	3d
17M0549	Oberschenkel	48	CMN (compound Typ)	SMAD4	c.1088G>A p.C363Y	1685	47%	3d
17M0579	Bauch	43	CMN (compound Typ)	HRAS	c.368G>A p.R123H	894	4%	2c
17M0579	Bauch	43	CMN (compound Typ)	HRAS	c.173C>R p.T58I	329	37%	2c
17M0579	Bauch	43	CMN (compound Typ)	KIT	c.1747G>A p.E583K	1839	7%	3d
17M0541	Schulterblatt	72	CMN (compound Typ)	NRAS	c.52G>A p.A18T	1174	15%	2a
17M0541	Schulterblatt	72	CMN (compound Typ)	NRAS	c.37G>A p.G13S	1171	5%	2a
17M0541	Schulterblatt	72	CMN (compound Typ)	NRAS	c.35G>A p.G12D	1169	10%	2a
17M0541	Schulterblatt	72	CMN (compound Typ)	NRAS	c.34G>A p.G12S	1176	9%	2a
17M0541	Schulterblatt	72	CMN (compound Typ)	PIK3CA	c.277C>T p. R93W	229	4%	3d
17M0541	Schulterblatt	72	CMN (compound Typ)	SMAD4	c.1157G>A p.G386D	1480	7%	3d
17M0541	Schulterblatt	72	CMN (compound Typ)	MTOR	c.5395G>A p.E1799K	1830	7%	3d
17M0541	Schulterblatt	72	CMN (compound Typ)	BRAF	c.1396G>A p.G466R	940	11%	2c

Bei 4 der insgesamt 62 (6%) untersuchten Proben von CMN konnten weder durch konventionelle Sanger-Sequenzierung noch mittels NGS-basierter Panel-Diagnostik ursächliche Mutation detektieren werden.

3.3 Ergebnisse der epidermalen Nävi

Aufgrund des breiter zu erwartenden Mutationsspektrums, wurden die EN ausschließlich mit NGS-basierter Panelsequenzierung (Illumina TruSeq Custom Amplicon Panel) untersucht.

Insgesamt wurden 15 epidermale Nävi auf ihr Mutationsspektrum untersucht. Die Zusammenfassung der Ergebnisse wurde in Tabelle 13 dargestellt.

Bei neun der Fälle (9/15, 60%) konnte eine bereits bekannte Mutation nachgewiesen werden und somit der Klasse 1 zugeordnet werden. Dabei war die HRAS-Mutation c.37G>C p. G13R mit 55% die häufigste und stellte somit eine Hotspotmutation dar. Den weiteren vier Proben konnte je eine KRAS-Mutation (c.35G>T p.G12V bzw. c.35G>A p. G12D) oder eine FGFR3-Mutation (c.742C>T p. R248C bzw. c.1114G>T p. G372C) zugeordnet werden.

Drei weitere Nävi konnten der Gruppe 2a zugeordnet werden (eine HRAS- und zwei FGFR3-Mutationen).

In einem Nävus konnte die EGFR-Mutation c.2188C>T p. L730F oberhalb der Artefaktschwelle detektiert werden. Bisher wurden keine EGFR-Mutationen im Zusammenhang mit EN beschrieben, weshalb die Einordnung als mögliche kausale Variante vorgenommen wurde.

In einem weiteren Nävus fanden sich nach der Auswertung noch zwei mögliche Mutationen, die den EN hervorgerufen haben könnten. Zum einem die HRAS-Mutation c.187G>A p. E63K und die GNAQ-Mutation c.548G>A p. R183Q.

Lediglich bei einer Probe konnte keine ursächliche bzw. Kandidatenmutation detektiert werden.

Tabelle 13: Ergebnisse der Mutationsanalysen der EN

Proben-Nr.	Exzisionsort	Alter	Gen	Mutation	Total Reads	VAF	Klasse
17M1184	Hals	23	HRAS	c.37G>C p.G13R	1849	39%	1
17M1192	Halsansatz re.	9	HRAS	c.37G>C p.G13R	6529	31%	1
17M1737	Schläfe re.	36	HRAS	c.37G>C p.G13R	1730	11%	1
17M1739	Hals li.	25	HRAS	c.37G>C p.G13R	3106	22%	1
17M1182	Kopf li.	16	HRAS	c.37G>C p.G13R	1921	23%	1
17M1743	Nacken re.	9	FGFR3	c.742C>T p.R248C	4712	21%	1
17M1198	Schläfe li.	72	FGFR3	c.1114G>T p.G372C	3421	12%	1
17M1194	Rücken	13	KRAS	C.35G>T p.G12V	6583	26%	1
17M1745	Rücken	39	KRAS	c.35G>A p.G12D	3261	17%	1

17M1196	Retroaurikulär	18	HRAS	Insertion p.G13AGG	1492	12%	1
17M1186	Hals	18	FGFR3	c.742C>T p.R248C	1249	3%	2a
17M1735	Knie re.	30	FGFR3	c.742C>T p.R248C	6300	3%	2a
17M1190	Kopf rechts	52	EGFR	c.2188 C>T p.L730F	1032	2%	3a
17M1188	Wange links	20	GNAQ	c.548G>A p.R183Q	2971	3%	3b
17M1741	Ellenbeuge	17		n.d.			4

n.d.= nicht detektierbar

3.4 Ergebnisse der Talgdrüsenhyperplasien (SGH)

Die Talgdrüsenhyperplasien (SGH, *sebaceous gland hyperplasia*) wurden aufgrund ihres breiten Mutationsspektrum mittels NGS-basierter Panelsequenzierung (Illumina TruSeq Custom Amplicon Panel) untersucht.

Insgesamt wurden 15 Talgdrüsenhyperplasien auf ihr Mutationsspektrum untersucht. Die Zusammenfassung der Ergebnisse wurde in Tabelle 14 dargestellt.

In 5 der 15 Fälle (33,3%) konnten bereits bekannte Mutation in den Genen EGFR, HRAS und KRAS nachgewiesen und der Klasse 1 zugeordnet werden. Varianten zweier weiterer Nävi wurden in die Klasse 2a einsortiert.

In einer SGH konnte die EGFR-Mutation c.2368C>T p. T790M oberhalb der Artefaktschwelle detektiert werden. Andere EGFR-Mutationen wurden bereits im Zusammenhang mit den SGH beschrieben, weshalb diese Mutation als mögliche Erweiterung des Mutationsspektrums angesehen wurde. Eine weitere Probe wies die HRAS-Mutation c.351G>T p.K117N und konnte der Klasse 2c zugeordnet werden. Eine SGH wies außerdem die SMAD4-Mutation c.1081C>T p. R361C auf. Ein Zusammenhang zwischen SMAD4-Mutationen und den SGH wurde bisher nicht beschrieben, weshalb diese Variante der Klasse 3d zugeordnet wurde. Die Auswertung zeigte bei 4 weiteren Proben mehrere Varianten, die als potenziell ursächlich angesehen werden könnten.

Lediglich bei einer Probe konnte keine ursächliche bzw. Kandidatenmutation detektiert werden.

Tabelle 14: Ergebnisse der Mutationsanalysen der SGH

Proben-Nr.	Exzisionsort	Alter	Gen	Mutation	Total Reads	VAF	Klasse
17M1731	Stirn	80	EGFR	c. 2573T>G p.L858R	7669	10%	1
17M1717	Schläfe links	76	EGFR	c. 2573T>G p. L858R	10109	4%	1
17M1721	Retroaurikulär	24	HRAS	c.37G>C p. G13R	37	6%	1
17M1711	Wange re.	70	HRAS	c.181C>A p.Q61K	17	35%	1
17M1709	Gesicht	63	KRAS	C.35G>T p.G12V	235	22%	1
17M1733	Nase	65	HRAS	c.182A>G p.Q61R	872	3%	2a
16M2509	Stirn re.	66	EGFR	c. 2573T>G p. L858R	3715	6%	2a
17M1723	Schläfe rechts	79	EGFR	c.2368C>T p. T790M	1699	3%	2b
17M1719	Wange	54	HRAS	c.351G>T p. K117N	3382	9%	2c
16M2510	Nasenflügel	67	SMAD4	c.1081C>T p. R361C	2674	6%	3d
17M1713	Hals	74	HRAS	c.38G>A p. G13D	1186	5%	2a
17M1713	Hals	74	HRAS	c.37G>A p. G13S	1182	6%	2a
17M1713	Hals	74	HRAS	c.34G>A p. G12S	1181	8%	2a
17M1713	Hals	74	KRAS	c.436G>A p.A146T	518	17%	2c
17M1729	Schläfe	75	FGFR3	c.1114G>T p.G372C	564	4%	3d
17M1729	Schläfe	75	EGFR	c.866C>T p.A289V	1144	3%	3d
17M1729	Schläfe	75	JAK2	c.1541C>T p.T514M	143	14%	3d
17M1729	Schläfe	75	BRAF	c.1798G>A p.V600M	2904	2%	2c
17M1729	Schläfe	75	KRAS	c.38G>A p.G13D	1909	2%	2c
17M1707	Wange	58	NRAS	c.38G>A p.G13D	543	16%	3b
17M1707	Wange	58	GNAS	c.2530C>T p.R844C	579	7%	3d
17M1715	Nase	83	DICER1	c.5113G>A p.E1705K	1123	3%	3d
17M1715	Nase	83	SMAD4	c.1088G>A p.C363Y	1715	2%	3d
17M1727	Stirn	56		n.d.			4

n.d.= nicht detektierbar

3.5. Ergebnisse der Analysen bei einem komplexen Nävussyndrom

Im Rahmen einer interdisziplinären Kooperation konnte ein Fall eines komplexen Nävussyndroms untersucht werden, das phänotypische Merkmale sowohl einer NCM als auch einer ECCL trug. Bei der Patientin handelte es sich um ein Kleinkind nicht-konsanguiner und gesunder Eltern. Die Familienanamnese für Erkrankungen aus dem Spektrum der (Mosaik)-RASopathien war unauffällig. Phänotypisch zeigte die Patientin einen GCMN mit multiplen Knoten, der sich vom Nacken bis in den unteren Lumbalbereich erstreckte, und zusätzlich einige Satellitennävi. Histopathologisch wurden Nester und Stränge von Melanozyten in der Dermis detektiert, die mit dem typischen Bild eines CMN vereinbar waren. Es zeigte sich zudem ein Tumor in der linken Temporalregion, der fast haarlos erschien und teilweise mit hyperpigmentierter Haut bedeckt war. Klinisch bestand die Verdachtsdiagnose eines Lipoms. Die hyperpigmentierten Areale zeigten histologisch das Bild eines komplexen Hamartoms, mit typischen Zeichen eines CMN. Im restlichen Teil des Tumors war ein differentes histologisches Bild mit einer deutlichen Vermehrung der Haarfollikel in verschiedenen Entwicklungsstadien, Hyperplasien der Talgdrüsen und fokaler Verminderung ekkriner Drüsen, vereinbar mit der Diagnose eines Naevus sebaceus zu sehen. Ophthalmologisch zeigte sich linksseitig ein epibulbäres Dermoid am lateralen Kanthus sowie funduskopisch einem Choroideadefekt. Mittels Schädel-MRT wurden bilaterale Lipome am zerebellopontinen Übergang detektiert. Parenchymale oder leptomeningeale Melanozytenansammlungen bestätigten sich radiologisch nicht, wobei eine spinale Ansammlung, aufgrund fehlender Bildgebung, nicht ausgeschlossen werden konnte. Neurologisch wurde zusätzlich über ein Krampfanfallsleiden berichtet. Zusammenfassend handelte es sich somit um eine sehr seltene Kombination aus einem CMNS und einer ECCL. Die klinischen Befunde wurden in Abbildung 8 zusammengefasst.

Zur Gewinnung von DNA und zur genetischen Untersuchung wurden therapeutische Resektate sowie Hautbiopsien verwendet. Zusätzlich wurden Zellkulturen von Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten angelegt.

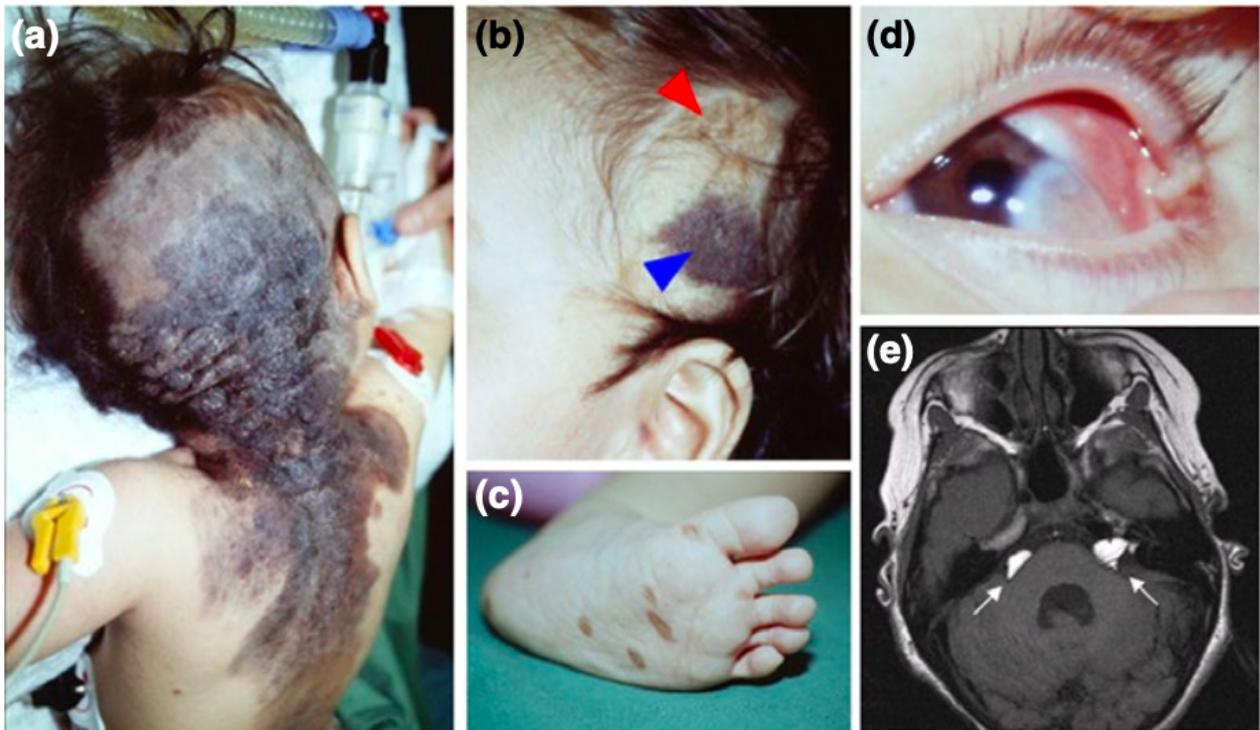


Abb. 8: Klinischer Befund und MRT einer 2jährigen Patientin mit CMNS und ECCL. (a) GCMN (b) Lipomverdächtiger Tumor der links fronto-temporal unter einem Nävus mit hyperpigmentiertem (blauer Pfeil) und nicht-pigmentiertem Anteil (roter Pfeil) (c) Satellitennaevi der linken Fußsohle. (d) Epibulbäres Dermoid am linken lateralen Kanthus (e) Native, axiale T1-gewichtete MRT des Schädels mit Lipom-typischen Befunden bilateral (weiße Pfeile) am zerebello-pontinen Übergang.

Zur Untersuchung standen multiple Gewebeproben sowohl läsionaler als auch nicht-läsionaler Haut zur Verfügung. Zusätzlich wurden Zellkulturen (Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten) angelegt, die ebenfalls molekulargenetisch untersucht wurden. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 15.

In allen Proben aus läsionalem Gewebe konnte die NRAS-Mutation c.181C>A p.Q61K nachgewiesen werden. Die mutierte Allel-Frequenz wurde per Sanger-Sequenzierung bestimmt und lag zwischen 9% und 37%. Auch in den drei Zellkulturen konnte diese NRAS-Mutation nachgewiesen werden, was für eine Mutation im frühen Entwicklungsstadium einer multipotenten Stammzelle spricht. Bei der Untersuchung nicht-läsionalen Gewebes konnte hingegen keine NRAS-Mutation nachgewiesen werden. Zudem zeigte keine der Proben Hotspotmutationen in KRAS bzw. FGFR1, die zuvor als Auslöser der ECCL bzw. des OES beschrieben wurden. Um die Detektionsgenauigkeit zu erhöhen, die bei der Sanger-Sequenzierung bei diesen untersuchten DNA-Proben oberhalb 7-15% liegt, wurden NGS-basierte Untersuchungen mittels Illumina TruSeq Custom Amplicon Panel durchgeführt. Auch bei Verwendung dieser Technik mit einer Detektionsschwelle von ca. 1% konnte keine der

vorbeschriebenen Mutationen für ECCL/OES, noch eine andere somatische Mutation in Genen, die durch das Panel abgedeckt wurden, gefunden werden.

Tabelle 15: Grad des Mosaiks der NRAS-Mutation in den untersuchten Geweben

Untersuchte Probe	Probenursprung	VAF (%) c.181C>A¹
Kultivierte Melanozyten	CMN (Abrasio der Nackenregion)	33
Kultivierte Melanozyten	nicht-läsionale Haut (außerhalb des Nävus)	n. d.
Kultivierte Melanozyten	nicht-hyperpigmentierte Haut, die den lipomatösen Tumor bedeckt	37
CMN	Resektat der Läsion Nacken	17/25
Knoten des CMN	Resektat der Läsion Nacken	26
Kultivierte Fibroblasten	nicht-läsionale Haut (außerhalb des Nävus)	n.d./n.d.
Kultivierte Fibroblasten	nicht-hyperpigmentierte Haut, die den lipomatösen Tumor bedeckt	9/40
Kultivierte Fibroblasten	hyperpigmentierte Haut, die den lipomatösen Tumor bedeckt	17/42
Kultivierte Fibroblasten	CMN (Abrasio der Nackenregion)	n.d.
Kultivierte Keratinozyten	hyperpigmentierte Haut, die den lipomatösen Tumor bedeckt	30
Gemischter Nävus	Hyperpigmentierte Haut, die den lipomatösen Tumor bedeckt	25/33

n. d. = nicht detektierbar; ¹VAF des mutierten Allels errechnet aus der Sanger-Sequenzierung/NGS-Panel

3.6 Ergebnisse zu sekundären malignen Melanomen (MM) bei CMN

Das maligne Melanom ist die häufigste maligne Tumorassoziation der CMN. Mit der Zunahme des Schweregrads des Phänotyps steigt die Entartungstendenz der CMN. Wir konnten zwei Probenpaare molekulargenetisch untersuchen, bei denen ein MM auf dem Boden eines CMN entstanden war. Die Untersuchungen der Proben erfolgte durch NGS-basierte Panelsequenzierung (Illumina TruSeq Custom Amplicon Panel).

Das erste Probenpaar zeigte sowohl im CMN als auch im MM die bekannte BRAF-Mutation c.1799T>A p.V600E oberhalb der für die Probe gemäß 2.3.7.4 deteminierten Artefaktschwelle. Die Frequenzen des mutierten Allels (VAF) lagen bei 29% bzw. 32%. Zusätzlich konnte im MM die CTNNB1-Mutation c.98C>T p.S33F mit einer VAF von 16% gefunden werden. Die Ergebnisse fasst Tabelle 16 zusammen.

Tabelle 16: Mutationsanalyse MM auf CMN (Probenpaar 1)

Proben-Nr.	Diagnose	Gen	Mutation	Total Reads	VAF
19M1652	CMN	BRAF	c.1799T>A p.V600E	7671	29%
19M1651	MM	CTNNB1	c.98C>T p.S33F	928	16%
19M1651	MM	BRAF	c.1799 T>A p.V600E	12733	32%

Das zweite Probenpaar wies ein heterogeneres Mutationsspektrum auf. Der CMN wies die bekannte NRAS-Mutation c.37G>A p.G13S mit einer VAF von 2% auf. Nach Anwendung unserer internen Filterkriterien zeigten sich drei Varianten, die Treiber-Mutationen für das MM sein konnten. Neben der bekannten NRAS Mutation c.181C>A p.Q61K waren das jeweils eine Mutation im CTNNB1- und GNAS-Gen. Die VAF lag dabei zwischen 2% und 5%. Die VAF für diese Varianten überstiegen allerdings nicht die für die Proben gemäß 2.3.7.4. determinierte Artefaktschwelle für die NGS-basierte Panelsequenzierung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 17: Mutationsanalyse MM auf CMN (Probenpaar 2)

Proben-Nr.	Diagnose	Gen	Mutation	Total Reads	VAF
19M1654	CMN	NRAS	c.37G>A p.G13S	3742	2%
19M1653	MM	NRAS	c.181C>A p.Q61K	4288	5%
19M1653	MM	CTNNB1	c.101G>T p.G34V	1438	2%
19M1653	MM	GNAS	c.2530C>T p.R844C	6668	3%

4. Diskussion

4.1 Kongenitale Nävi und Mosaik-RASopathien

Die überwiegende Anzahl der von uns im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Nävi waren entweder melanozytärer oder epidermaler Herkunft und können letztlich der Gruppe der kongenitalen Mosaik-RASopathien zugeordnet werden (Zenker & Kutsche, 2016). Die untersuchten Talgdrüsenhyperplasien gehören nicht zu der Gruppe der kongenitalen Mosaik-RASopathien, weisen aber als kutanes Mosaik, das durch aktivierende Mutationen im RAS-MAPK-Signalweg hervorgerufen wird, Ähnlichkeiten zu diesem Erkrankungsspektrum auf und lassen sich daher der Gruppe der postnatalen Mosaik-RASopathien zuordnen. (Groesser et al., 2016).

4.1.1 Beurteilung der Mutationen kongenitaler melanozytärer Nävi

In 80,6% der 67 untersuchten CMN gelang uns der Nachweis einer ursächlichen Mutation. Dies steht im Einklang mit bislang zum Thema veröffentlichten Ergebnissen. Eine Detektionsrate um 80% beschreiben auch andere Arbeitsgruppen (Bauer et al., 2007; Kinsler et al., 2013; Martins da Silva et al., 2019; Polubothu et al., 2020; Salgado et al., 2015).

Die häufigste nachgewiesene Mutation betraf mit 54% das BRAF-Gen (c.1799T>A p.V600E) und lag damit deutlich über den bislang publizierten Werten. *Salgado et al.* fanden in einer prospektiven Studie an 66 Patienten bei 7,6% die V600E-Mutation im BRAF-Gen (Salgado et al., 2015). *Charbel et al.* detektierten in ihrem Kollektiv in 30% der SCMN und MCMN diese BRAF-Mutation (Charbel et al., 2014). In einer weiteren großen Studie konnte bei 7% der 134 Patienten ebenfalls die BRAF-Mutation c.1799T>A, p.V600E als genetische Grundlage des CMN gefunden werden (Polubothu et al., 2020).

In 27% unserer untersuchten Fälle konnten NRAS-Mutationen (c.181C>A p.Q61K oder c.182A>G p.Q61R) nachgewiesen werden. Diese wurden bereits 2007 durch *Bauer et al.* in 26 von 32 CMN beschrieben (Bauer et al., 2007). *Kinsler et al.* konnten in einer prospektiven Studie bei 12 von 15 Patienten ebenfalls die NRAS-Mutationen (c.181C>A p.Q61K oder c.182A>G p.G61R) finden. Zusätzlich bestehende melanozytäre ZNS-Läsion zeigten die gleichen Mutationen, wie die kutanen Läsionen. Auch *Charbel et al.* zeigten, dass NRAS-Mutationen quantitativ die größte Bedeutung in der Pathogenese der CMN haben. So konnten sie bei 18 von 19 (94,7%) der LCMN und GCMN eine der beiden rekurrenten NRAS-

Hotspotmutationen finden. Bei den SCMN und MCMN waren es immerhin 70% (n=20), die eine NRAS-Mutation trugen (Charbel et al., 2014). Bei weiteren 21 Patienten konnten *Martins da Silva et al.* diese NRAS-Mutationen in 57,1% der Fälle als Ursache für LCMN bzw. GCMN beschreiben (Martins da Silva et al., 2019). Auch in einer aktuellen Studie von *Polubothu et al.* waren die NRAS-Mutationen bei 68% der 134 Patienten als Ursache für die Entstehung der CMN nachgewiesen worden (Polubothu et al., 2020)

Im Vergleich zur Literatur fällt daher in unserer Studie ein erhöhter Anteil der BRAF- und ein geringerer Anteil an NRAS-Mutationen auf. Dieser Unterschied lässt sich wahrscheinlich auf zwei Punkte zurückführen, die im Studiendesign mit einhergehender Anonymisierung der Patientendaten begründet sind. An klinischen Angaben war uns nur die pathologische Diagnose eines CMN bekannt. Die Information, ob der melanozytäre Nävus tatsächlich bei der Geburt schon klinisch manifest war, stand uns nicht zur Verfügung. Aufgrund der Anonymisierung der Patientendaten im Studienprotokoll war auch eine Rückverfolgung nicht möglich. Arbeitsgruppen, in denen der Anteil der NRAS-Mutationen deutlich höher lagen, inkludierten nur Patienten in ihre Studien, die bei der Geburt manifeste CMN aufwiesen (Bauer et al., 2007; Kinsler et al., 2013). So unterschieden Bauer et al. in ihrer Arbeit zwischen „echten“, bereits bei der Geburt manifestierten CMN und melanozytären Nävi, die zwar histologische Merkmale eines CMN trugen, aber erst im Laufe des Lebens klinisch manifest wurden (Bauer et al., 2007). *Roh et al.* adressierten das Problem in ihrem Review und zeigten, dass die Unterschiede in den Häufigkeiten für BRAF- und NRAS-Mutationen in unterschiedlichen Diagnosekriterien begründet waren (Roh et al., 2015). Ein weiterer wichtiger klinischer Diagnosefaktor bei CMN stellt die Größe dar (Krengel et al., 2013). Angaben zur Größe der untersuchten Nävi lagen uns nicht vor, sodass eine Einteilung der CMN in die Klassen nach ihrem maximalen Durchmesser (in cm) nicht erfolgen konnte. Es existiert jedoch eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation, die mit einem bestimmten Mutationsmuster einhergeht (Roh et al., 2015). So entstehen die NCM oder große CMN eher aufgrund einer NRAS-Mutation, wohingegen die kleinen CMN zu einem höheren Prozentsatz aufgrund der BRAF-Mutation entstehen (Bauer et al., 2007; Charbel et al., 2014; Kinsler et al., 2013; Polubothu et al., 2020). Nach unserem Wissensstand konnten nur zwei Arbeitsgruppen für einen kleinen Teil ihrer Patientenkollektive bei LCMN/GCMN die BRAF-Mutation p.V600E rekurrent nachweisen und als Ursache für LCMN/GCMN beschreiben (Polubothu et al., 2020; Salgado et al., 2015). Auch diese Genotyp-Phänotyp-Korrelation scheint, bei fehlender Beschreibung der Größe des CMN, mit zur Inkonsistenz der Studien in Bezug auf das Mutationsspektrum der CMN beigetragen zu haben (Roh et al., 2015).

Im Kontext der publizierten und in dieser Arbeit zitierten Daten kann angenommen werden, dass der Anteil der bereits bei der Geburt manifesten und großen melanozytären Nävi an unseren Gewebeproben geringer war.

Bei der Untersuchung einer weiteren pathologisch als CMN klassifizierten Probe konnten wir nach Anwendung unserer Filteralgorithmen die RHOA-Mutation c.139G>A p. E47K mit einem signifikanten Mosaikanteil von 37% detektieren. Nach unserem Wissen wurden bisher keine RHOA-Mutationen im Zusammenhang mit CMN beschrieben. *Vabres et al.* wiesen diese Mutation allerdings in mehreren Patienten nach, die klinisch Hypopigmentierungen entlang der Blaschko-Linien, Alopezie, eine asymptotische Leukenzephalopathie sowie faziale, okuläre, dentale und akrale Anomalien aufwiesen. Bei diesen Patienten konnte die gleiche Mutation nur in läsionalem Gewebe nachgewiesen werden und war nicht in Leukozyten-DNA detektierbar. Dies führte zu dem Schluss, dass es sich um eine (neuro-)ektodermale Mosaikerkrankung handelt, die aufgrund der genetischen Grundlage von den Autoren als „RHOA-related mosaic ectodermal dysplasia“ bezeichnet wurde (*Vabres et al., 2019*). Aufgrund der hohen VAF von 37%, die ein Artefakt sehr unwahrscheinlich macht, und der vorbeschriebenen Assoziation mit einem (neuro-)ektodermalen Syndrom kann die RHOA-Mutation c.139G>A p. E47K als mögliche pathogene Variante in der Entstehung der histopathologisch als CMN klassifizierten Läsionen in diesem Fall angesehen werden. Leider war aus den oben genannten Gründen eine Re-Evaluation des Phänotyps nicht möglich.

Bei den Proben mit multiplen Kandidatenmutationen (Tabelle 10) können keine abschließenden Aussagen zur Ursächlichkeit der Mutationen getroffen werden. Einige Alterationen sind bekannte Mutationen des RAS-MAPK-Signalweges, die bereits im Zusammenhang mit (Mosaik)-RASopathien beschrieben wurden. Die Vielzahl der möglichen Kandidatenmutationen mit zumeist geringer VAF sprechen aber eher für Artefakte, die aufgrund der geringen Qualität der DNA und folgender PCR-Produkte entstanden sein können. Bemerkenswert ist jedoch in Probe 17M0579 der Nachweis der HRAS-Mutation p.T58I mit einer VAF im fast heterozygoten Bereich (37%). Dies ist eine Variante, die bereits wiederholt als Keimbahnmutation bei Patienten mit einer mildereren Form des Costello-Syndroms beschrieben wurde (*Gripp et al., 2012*). Es ist daher möglich, dass in diesem Fall eine Keimbahn-RASopathie als Grunderkrankung vorgelegen hat.

4.1.2 Beurteilung der Mutationen epidermalen Nävi

Bereits 2012 identifizieren *Hafner et al.* die HRAS-Mutation c.37G>C p.G13R als häufigste genetische Veränderung in KEN und beschrieben sie als Hotspotmutation (Hafner et al., 2012). Wir konnten diese Ergebnisse mittels hochsensitiver NGS-basierter Panel Diagnostik in der vorliegenden Arbeit an unserem Kollektiv bestätigen. Neben den HRAS-Mutationen, die wir in 33% der Fälle beobachteten, waren in unserem Patientengut auch Alterationen im KRAS-Gen (c.35G>T p.G12V bzw. c.35G>A p.G12D) und im FGFR3-Gen (c.742C>T p.R248C bzw. c.1114G>T p.G372C) nachweisbar. Auch diese Mutationen wurden bereits als Ursache in der Pathogenese der KEN beschrieben (Hafner et al., 2006, 2012).

Neben der Replikation bereits bekannter Mutationen, konnten wir bei einem Nävus die EGFR-Mutation c.2188C>T p.L730F nachweisen. Die Frequenz des mutierten Allels lag bei 2,3% und damit in einem niedrigen Bereich, aber über der für die Probe determinierten Artefaktschwelle. Nach unserem Wissensstand wurden bisher keine EGFR-Mutationen im Zusammenhang mit KEN beschrieben. Bislang waren Alterationen im EGFR-Gen als genetische Ursache z. B. für Talgdrüsenhyperplasien, einer weiteren Mosaik-Erkrankung, beschrieben worden. Letztlich kann diese Mutation als mögliche Kandidatenvariante in der Erweiterung des Mutationsspektrums der KEN angesehen werden, wobei eine Verifizierung der Variante in dieser Probe durch eine zweite unabhängige Analyse nicht durchgeführt wurde (mittels Sanger-Sequenzierung nicht möglich, da die VAF mit 2,3% unter der Detektionsschwelle dieser Methode lag).

Bei der Untersuchung eines weiteren KEN konnten wir unter Verwendung interner Filteralgorithmen noch zwei weitere Kandidatenmutationen identifizieren. Hierbei handelte es sich um die HRAS-Mutation c.187G>A p.E63K und die GNAQ-Mutation c.548G>A p.R183Q, welche in derselben Probe detektiert wurden. Die HRAS-Mutation wurde bereits im Zusammenhang mit dem Costello-Syndrom beschrieben (Gripp & Lin, 2012), das selbst zu den RASopathien gehört und durch die Hyperkeratosen eine klinische Überschneidung zu den KEN hat. Die Alteration im GNAQ-Gen ist eine bekannte rekurrente *gain-of-function*-Mutation, die den RAS-RAF-MAPK-Signalweg aktiviert und stellt eine Hotspotmutation in der Pathogenese der Mosaikerkrankungen des Nävus flammeus sowie des Sturge-Weber-Syndroms dar (Lian et al., 2014; Shirley et al., 2013). Für beide Mutationen, die durch NGS-basierte Panelsequenzierung nachgewiesen wurden, lagen die Ergebnisse aber unter der für die Probe determinierten Artefaktschwelle. Eine Verifizierung durch eine unabhängige zweite Analyse war nicht möglich. Damit kann nicht abschließend geklärt werden, ob eine der beiden Mutationen ursächlich für die Entstehung des KEN war oder ob es sich sogar um eine

Doppelmutation handeln könnte, wie es *Hafner et al.* für einen Teil der untersuchten Nävi beschrieben haben (Hafner et al., 2012).

4.1.3. Beurteilung der Mutationen der Talgdrüsenhyperplasien

Nach *Groesser et al.* umfassen die genetischen Grundlagen in der Entstehung der Talgdrüsenhyperplasien ein breites Spektrum aktivierender somatischer Mutationen im HRAS-, KRAS- und EGFR-Gen (Groesser et al., 2016). Diese Ergebnisse konnten an 7 (46,6%) der 15 innerhalb dieser Arbeit untersuchten Proben bestätigt werden. Neben 3 EGFR- (c. 2573T>G p.L858R) und 3 HRAS-Mutationen (c.37G>C p. G13R; c.181C>A p.Q61K; c.182A>G p.Q61R) konnten wir eine KRAS-Mutation (c.35G>T p.G12V) detektieren.

An einer weiteren Läsion konnten wir die EGFR-Mutation c.2368C>T p.T790M nachweisen, für die die geringe VAF aber eine Unterscheidung von einem Artefakt nicht möglich machte. Alterationen im EGFR-Gen konnten bereits als Ursache in der Entstehung der SGH detektiert werden, wenngleich die EGFR-Mutation c.2368C>T p.T790M noch nicht beschrieben wurde. Aufgrund der niedrigen VAF des mutierten Allels (3%) war eine Verifizierung des Ergebnisses mittels Sanger-Sequenzierung nicht möglich. Damit kann diese Mutation als mögliche Erweiterung des Mutationsspektrums der SGH angesehen werden.

Nach Anwendung unserer internen Filterkriterien konnte bei einer weiteren Probe die HRAS-Mutation c.351G>T p. K117N beschrieben werden. Die VAF lag dabei bei 9% und damit über der probenspezifischen determinierten Artefaktschwelle. Eine Bestätigung des Ergebnisses mittels konventioneller Sanger-Sequenzierung war aufgrund des Detektionslimits von $\geq 10\%$ nicht erfolgreich. In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Mutationen im HRAS-Gen als molekulargenetische Grundlage für die Talgdrüsenhyperplasien beschrieben (vgl. Tabelle 1). Alterationen im Kodon 117 des HRAS-Gens wurden bisher noch nicht als Ursache der SGH detektiert, allerdings im Zusammenhang mit RASopathien (Costello-Syndrom) publiziert (Kerr et al., 2006). Somit stellt die HRAS-Mutation c.351G>T p.K117N eine mögliche Erweiterung des Mutationsspektrums der SGH dar.

Bei den Proben mit multiplen Kandidatenmutationen (Tabelle 12) können, ähnlich zu den Proben der CMN, keine abschließenden Aussagen zur Ursächlichkeit der detektierten Varianten getroffen werden. Hier zeigten sich teilweise bekannte Mutationen des RAS-MAPK-Signalweges, die im Zusammenhang mit (Mosaik)-RASopathien beschrieben wurden. Besonders die Mutationen des NRAS-, HRAS- und KRAS-Gens in Kodon 12 und 13 sind hier als mögliche molekulargenetische Ursache in der Entstehung der SGH zu nennen. Zudem konnte in einer dieser Proben die KRAS-Mutation c.436G>A p.A146T, die bereits im

Zusammenhang mit mehreren neuroektodermalen Syndromen (ECCL und OES) beschrieben wurde (Boppudi et al., 2016) und eine bekannte onkogene Mutation vor allem beim Kolonkarzinom darstellt, mit einer VAF von 17% detektiert werden. Diese Mutation könnte eine Erweiterung des Mutationsspektrums der SGH darstellen, allerdings konnte sie nicht per konventioneller Sanger-Sequenzierung an der DNA aus der Probe bestätigt werden. Insgesamt sprechen die Vielzahl der möglichen Kandidatenmutationen mit zumeist geringer VAF eher für artefaktbedingte Ergebnisse, die aufgrund der geringen Qualität der DNA und folgender PCR-Produkte entstanden sein können.

4.2. Beurteilung der Mutationen beim komplexen Nävus-Syndrom

Komplexe Nävussyndrome, die phänotypische Merkmale von CMNS und ECCL aufweisen, sind bislang nur in wenigen Fällen publiziert worden. *Ahmed et al. 2002* und *Jain et al. 2014* beschrieben kombinierte Phänotypen von CMNS und ECCL, wobei eine Untersuchung der molekulargenetischen Grundlagen nicht erfolgte (Ahmed et al., 2002; Jain et al., 2014).

Wir hatten nun die Möglichkeit, einen Fall eines komplexen Nävussyndroms, molekulargenetisch zu untersuchen und konnten die NRAS Mutation c.181C>A, p.Q61K als alleinige Ursache dieses gemischten Phänotyps mit sowohl Aspekten eines CMNS als auch einer ECCL detektieren (Ulrich et al. 2019). Obwohl nicht die Möglichkeit bestand, Gewebe zu untersuchen, das ausschließlich der ECCL zuzuordnen war (subkutanes Lipom, epibulbäres Dermoid, ZNS-Lipom), ist davon auszugehen, dass die untersuchten Proben die verschiedenen histologischen Bereiche bzw. unterschiedliche Zelllinien ausreichend repräsentierten.

Das SCALP-Syndrom, ein Akronym für Naevus sebaceus, CNS Malformationen, Aplasia cutis congenita, epibulbäres Dermoid und pigmentierter Nävus, ist ein weiterer Phänotyp, der Charakteristika des CMNS und der ECCL enthält (Lam et al., 2008). Hiervon wurden auch nur wenige Patienten beobachtet und in einem Fall eine Mosaik-Mutation des NRAS-Gens (p.Q61R) als genetische Grundlage beschrieben (Chan et al., 2018). CMN wurden auch im Zusammenhang mit dem Cutaneous Skeletal Hypophosphatemia Syndrome (CSHS) berichtet, das eine weitere Variante der Mosaik-RASopathien darstellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der überlappende Phänotyp vom CSHS mit CMN durch Mosaik-Mutationen im NRAS-Gen (p.Q61R) verursacht wird, wohingegen die Assoziation des CSHS mit EN eher durch Mosaik-Mutationen im HRAS-Gen hervorgerufen wird (Lim et al., 2014; Ramesh et al., 2017).

In Zusammenschau mit dem zitierten Arbeiten weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die kombinierten Phänotypen CMNS-ECCL, SCALP-Syndrom und CMNS-CSHS Erweiterungen des CMNS Spektrums sind. Es scheint, dass der Phänotyp der Mosaik-RASopathien nicht allein abhängig vom mutierten Gen des Signalweges ist, sondern auch von den betroffenen Zelllinien und dem Zeitpunkt des Auftretens der Mutation während der embryonalen Entwicklung mitbestimmt wird. Ein Befall von mehreren Zelllinien durch eine RAS-Mutation wurde bisher in einem Fall mit CSHS dokumentiert (Lim et al., 2014). In einem weiteren Fall mit einem kombinierten Phänotyp, bestehend aus einem CMN, einer vaskulären Malformation und Epidermalzysten, dessen Grundlage eine BRAF-Mutation war, wurde ebenfalls ein Befall mehrerer Zelllinien diskutiert (Etchevers et al., 2018). Somit scheint die Annahme, dass somatische Hotspotmutationen des RAS-MAPK-Signalweges im Zusammenhang mit Mosaik-RASopathien strenge Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zeigen und bestimmte Mutationen/Gene nur den Phänotyp eines bestimmten Läsionstyp hervorrufen, für die komplexen, mehrere Zelllinien betreffenden Nävussyndrome, nicht zuzutreffen. Vielmehr sprechen die Ergebnisse dafür, dass Mutationen in verschiedenen Genen des RAS-MAPK-Signalweges, die zu einen bestimmten Zeitpunkt der Zell- bzw. Gewebedifferenzierung auftreten, ähnliche Effekte auf den Phänotyp haben. Somit ist eine Erweiterung des klinischen Spektrums der Mosaik-RASopathien mit kombiniertem Phänotyp, zu erwarten.

4.3. Beurteilung der Mutationen der MM auf CMN

CMN sind bereits länger als Risikofaktor in der Entstehung eines malignen Melanoms bekannt und entarten in ca. 1-2% der Fälle (Kinsler et al., 2008, 2017; Krengel et al., 2006). Dabei weisen CMN in einem Großteil der Fälle NRAS- und BRAF-Mutationen auf (Bauer et al., 2007; Kinsler et al., 2013; Polubothu et al., 2020; Salgado et al., 2015). Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass zur malignen Transformation weitere Mutationen notwendig sind. In Bezug auf NRAS-Mutationen konnte beispielsweise der Verlust der Heterozygotie als weiterer Schritt in der Tumorgenese detektiert werden (Kinsler et al., 2013; Salgado et al., 2015). Analysen der molekulargenetischen Grundlagen von MM zeigten ein breites Mutationsspektrum, das sich über den MAPK-, Phosphoinositol-3-Kinase- und den P53-Protein-Signalweg erstreckt und besonders die Gene BRAF, NRAS, KIT, GNAQ und GNA11 betrifft (Xia et al., 2014).

Im ersten Probenpaar konnten wir die BRAF-Mutation c.1799T>A p.V600E sowohl im CMN als auch im MM nachweisen. Diese Mutation scheint ursächlich für die Entstehung des CMN zu sein. Zusätzlich konnten wir die CTNNB1-Mutation c.98C>T p.S33F im MM beschreiben. Mutationen im Kodon 33 des CTNNB1-Gens wurden bereits als Ursache der Transformation melanozytärer Nävi zu sogenannten „deep penetrating nevi“, einem Zwischenschritt in der malignen Entartung, beschrieben. Durch die zusätzliche Aktivierung des β -Catenin-Signalweges kommt es zu einer verminderten T-Zell-Antwort, die mutmaßlich zu einer Tiefeninfiltration des Nävus führt (Spranger et al., 2015; Yeh et al., 2017).

Eine weitere Erklärung für die Tiefeninfiltration der Melanozyten ist die Abhängigkeit vom Wachstumsfaktor WNT. Eine konstitutive Aktivierung des WNT-Signalweges durch Mutationen im CTNNB1-Gen treibt möglicherweise das Tiefenwachstum der Melanozyten und somit eine neoplastische Transformation an (Yeh et al., 2017).

Zusätzlich konnte für Melanome, Lungen-, Zervix- und Hepatozelluläre Karzinome gezeigt werden, dass neben der Aktivierung der für diese Entitäten bekannten Onkogene auch eine konstitutive Co-Aktivierung von CTNNB1 vorlag. Dies scheint mit einer aggressiveren Tumorgenese einherzugehen (Cho et al., 2017).

Wir gehen daher davon aus, dass die gefundene CTNNB1-Mutation einen entscheidenden Treiber-Effekt bei der Malignisierung der Läsion hatte, können aber nicht festlegen, in welcher Phase der Tumor-Evolution diese Läsion entstanden ist. Es ist davon auszugehen, dass auch noch andere Mutationen, die nicht von unserem limitierten Panel abgedeckt wurden (z.B. TERT-Mutationen), weitere entscheidende Schritte in der Tumorgenese waren. Für einen Verlust der Heterozygotie am BRAF-Lokus fanden wir keinen Hinweis.

Im CMN des zweiten Probenpaars konnten wir die NRAS-Mutation c.37G>A p.G13S detektieren. Alterationen im Kodon 13 des NRAS-Gens, die zu einer konstitutiven Aktivierung RAS-GTPase führen, wurden bereits als eine molekulargenetische Ursache der CMN beschrieben (Polubothu et al., 2020; Shih et al., 2014). Auffällig war, dass wir diese Mutation nicht im MM nachweisen konnten. Dort wurde allerdings die NRAS-Hotspotmutation c.181C>A p.Q61K gefunden, die als molekulargenetische Ursache sowohl der CMN als auch der MM bekannt ist (Hodis et al., 2012; Kinsler et al., 2013; Polubothu et al., 2020), die aber wiederum im CMN nicht nachweisbar war. Möglicherweise hat diese Mutation die NRAS-Mutation c.37G>A p.G13S als Treiber in der Tumorgenese des MM abgelöst. Aufgrund des Unterschreitens der institutseigenen Artefaktschwelle und der niedrigen VAF, die eine

Bestätigung der Mutation mittels konventioneller Sanger-Sequenzierung unmöglich macht, bleiben diese Aussagen aber spekulativ und können wissenschaftlich nicht sicher nachgewiesen werden.

Neben den beiden NRAS-Mutationen wurde wie im ersten Probenpaar eine CTNNB1-Mutation (c.101G>T p.G34V) gefunden. Auch diese Alteration scheint durch die Aktivierung des β -Catenin-Signalweges mit einer aggressiveren Tumorgenese einherzugehen (Gao et al., 2018). In Zusammenschau mit den Ergebnissen des ersten Probenpaars scheinen CTNNB1-Mutationen auch bei der Entstehung eines malignen Melanoms auf einem CMN, zumindest als co-aktivierende Mutation, eine wichtige Rolle in der malignen Entartung zu spielen.

4.4. Proben ohne Mutation

Lediglich 6 der insgesamt 97 (6,2%) untersuchten Proben melanozytärer und keratinozytärer Nävi sowie der Talgdrüsenhyperplasien konnten wir, weder per konventioneller Sanger-Sequenzierung noch per NGS-basierter Panelsequenzierung, einer pathogenen (Kandidaten-) Mutation zuordnen. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Aufgrund der Fixierung der Proben mit Formalin kommt es zur Quervernetzung der DNA mit Proteinen sowie zur Fragmentierung der DNA. Dies führt, trotz des Einsatzes spezieller FFPE-Kits, oftmals zu einer herabgesetzten Qualität des PCR-Produktes, was die Sequenzierungen erschwert. Insgesamt ist die Qualität als auch die Quantität der aus FFPE-Material gewonnenen DNA gering (Kerick et al., 2010). Dies konnten wir durch unsere eigenen Messungen mittels NanoDrop Spektralphotometer und Qubit Fluorometer bestätigen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die VAF des Mosaiks unter der Detektierbarkeitsgrenze der von uns verwendeten Nachweismethoden lag. Trotz des Einsatzes hochsensitiver NGS-basierter Panelsequenzierung, die grundsätzlich Mosaik bis zu einer VAF von ca. 1% erkennt, wäre dies theoretisch möglich. Die Detektionsschwelle von 1%, welche die Methode theoretisch erreichen könnte, wurde allerdings in vielen Proben wegen der Limitationen des Ausgangsmaterials und der daraus resultierenden PCR-Artefakte deutlich überschritten.

Zusätzlich könnten Mutationen in Genen, die nicht durch unsere Untersuchungen abgedeckt wurden, zur Entstehung der Nävusentitäten geführt haben. Weiterhin führten wir keine Untersuchungen am Transkriptom durch. Erst kürzlich konnten *Martins da Silva et al.* zeigen, dass auch Fusionstranskripte, die Onkogene (z.B. ALK-oder RAF-Gen) beinhalteten, zur Entstehung von CMN führen können (Martins da Silva et al., 2019).

4.5. Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit weist aufgrund des Studiendesings sowie des Probenmaterials einige Limitationen auf.

Methodisch wurde die Arbeit insbesondere durch die begrenzte Qualität und Menge der DNA aus den archivarischen FFPE-Gewebematerial limitiert. Durch die teilweise schlechte DNA-Qualität entstanden insbesondere bei den NGS-basierten Analysen ein hoher Hintergrund an PCR-Artefakten, der die Auswertung der Proben deutlich erschwerte. Die Definition Proben-spezifischer Artefaktschwellen, die wahrscheinlich die individuelle Qualität der jeweiligen Probe repräsentierten, ermöglichte eine gewisse Diskrimination in Proben mit schlechter Ausgangsqualität. Die Validierung der Ergebnisse durch eine zweite unabhängige Analyse, insbesondere bei Kandidatenmutationen mit einer geringen VAF durch ein zweites NGS-basiertes Verfahren, konnte mangels ausreichender DNA-Mengen und im zeitlichen sowie monetären Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Eine weitere methodische Limitation zeigte sich bei der Untersuchung der Malignen Melanome, die auf dem Boden eines kongenitalen melanozytären Nävus entstanden sind. Hier konnte aufgrund des engen Spektrums des NGS-basierten Panels mit den CTNNB1-Mutationen als sekundäre Ereignisse nur ein kleines Segment der komplexen molekularen Evolution im Tumorzellklon aufgezeigt werden. Um dies genauer verstehen zu können, müsste eine größere Anzahl solcher Probenpaare mit genauerer histopathologischen sowie breiteren Methoden der Genomanalyse aufgearbeitet werden. Insofern hatte dieser Teil der hier vorgestellten Arbeit lediglich Pilotcharakter für weitere Projekte.

Durch das experimentelle Design der Studie mit anonymisierten Proben, von denen nur die histopathologische Diagnose sowie das Alter der Patienten zum Exzisionszeitpunkt verfügbar waren, fehlte die Möglichkeit einer Re-Evaluation interessanter experimenteller Ergebnisse. So kann über die auffällige Häufigkeitsverschiebung zwischen NRAS- und BRAF-Mutationen in unserem Probenkollektiv der CMN gegenüber publizierten Daten nur spekuliert, die Vermutungen aber nicht durch weitere klinische Daten der Probanden verifiziert, werden. Besonders ungünstig ist die fehlende Möglichkeit einer Re-Evaluation des Phänotyps bei den unerwarteten und potentiell wissenschaftlich interessanten Ergebnissen wie der Detektion von pathogenen RHOA-, GNAQ- und atypischen HRAS-Mutationen.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der Dissertation konnten den aktuellen Stand der wissenschaftlichen Arbeiten auf dem Gebiet der Mutationsanalysen kongenitaler Nävi an einem unabhängigen Probenkollektiv bestätigen. Zudem detektierten wir einige interessante Kandidatenmutationen, die bisher für die vorliegenden Entitäten nicht beschrieben waren (RHOA, GNAQ, atypische HRAS-Varianten). Für kommende Forschungsarbeiten im Bereich der Mosaik-RASopathien bzw. Mosaikerkrankungen kann man aus der vorliegenden Arbeit folgende methodische und theoretische Schlüsse ziehen:

- (1) Die Diagnose von kutanen Mosaikerkrankungen sollte in Zusammenarbeit von Dermatologen, Pathologen und Humangenetikern gestellt werden. Rein dermatohistologische Diagnosestellungen können aufgrund ungenauer histologischer Definitionen und morphologischer Überschneidungen ungenau oder fehlerhaft sein. Der Mutationsnachweis kann die diagnostische Zuordnung unterstützen.
- (2) Durch Zusammenarbeit mit weiteren Kliniken/Instituten sollten für eine Ausweitung des hier vorgestellten Projekts Proben prospektiv gesammelt und die DNA aus Frischgewebe gewonnen werden, um eine höhere Qualität und Quantität der DNA zu erreichen. Dies sollte während der PCR entstandene Artefakte in den Sequenzierungen minimieren und damit zu eindeutigen Ergebnissen führen. Auch methodische Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Sequenzieretechnologie können die Präzision der Mosaik-Detektion erhöhen.
- (3) Die bisher vermuteten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sollen weiter überprüft und ggf. überdacht werden. Einige Studien, besonders im Bereich CMN, zeigen enge Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beispielsweise zwischen NRAS-Mutationen und GCMN auf (Bauer et al., 2007; Kinsler et al., 2013; Polubothu et al., 2020). Verschiedene andere Studien (Etchevers et al., 2018; Lim et al., 2014; Ulrich et al., 2019) haben bei komplexen Nävussyndromen gezeigt, dass eine Mutation mehrere überschneidende Phänotypen aus dem Spektrum der Mosaik-RASopathien hervorrufen kann.
- (4) Wir haben zudem neue mögliche Kandidatenmutationen im Mutationsspektrum der einzelnen Entitäten gefunden. Weitere Studien sind erforderlich, um diese als Kandidaten zu bestätigen.
- (5) Zukünftige Forschungen werden das Wissen über die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen erweitern und es ermöglichen, daraus Schlüsse für die Diagnosestellung

und ggf. auch für eine gezielte Behandlung der verschiedenen Nävusentitäten zu ziehen.

5. Zusammenfassung

Unter dem Begriff Mosaik-RASopathien wird eine Gruppe von (neuro-)kutanen Erkrankungen subsumiert, deren molekulargenetische Ursache aktivierende, somatische Mutationen in Genen des RAS-MAPK-Signalwegs darstellen. Teil dieser Erkrankungsgruppe sind, die in der Dissertation untersuchten kongenitalen Nävi sowie die damit assoziierten neurokutanen Syndrome, wie die Neurokutane Melanose, das Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndrom, die Enzephalokraniokutane Lipomatose und das Okuloektodermale Syndrom. Die Aufklärung der molekulargenetischen Ursachen der oben aufgeführten Entitäten und die damit einhergehende Klassifizierung als Mosaik-RASopathien erfolgte ab dem Jahr 2012 durch verschiedene Arbeitsgruppen, u.a. *Groesser et al.*, *Kinsler et al.* und *Hafner et al.* In dieser Dissertation wurden an insgesamt 108 Proben verschiedener Nävusentitäten Mutationsanalysen mithilfe konventioneller Sanger-Sequenzierung als auch NGS-basierter-Panelsequenzierung durchgeführt. Bei dem Großteil der Proben konnten Mutationen in den Genen NRAS, HRAS, KRAS, BRAF, EGFR und FGFR3 gefunden werden. Diese Ergebnisse konnten den aktuellen Forschungsstand in Bereich der Mosaik-RASopathien bestätigen. In einigen Analysen konnten wir neue mögliche Kandidatenmutationen detektieren, deren Bedeutung in weiteren Forschungsarbeiten geklärt werden muss.

Zusätzlich konnte ein Fall eines seltenen komplexen Nävussyndroms, das phänotypische Merkmale eines kongenitalen melanozytären Nävussyndroms als auch der Enzephalokraniokutanen Lipomatose trug, molekulargenetisch untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen phänotypischen Ausprägungen allein durch eine vermutlich embryonal frühe NRAS-Mutation (c.181C>A p. Q61K) hervorgerufen wurden.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des RAS-MAP-Kinase Signaltransduktionswegs nach (Thatcher, 2010)	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aufreinigung der DNA	17
Abbildung 3: Gelelektrophorese von PCR-Produkten des Exon 15 des BRAF-Gens	21
Abbildung 4: Aufreinigung des PCR-Produkts laut Protokoll des Herstellers (Agencourt Bioscience Corporation, 2013)	22
Abbildung 5: Aufreinigung des Sequenzierungsprodukts laut Protokoll des Herstellers Agencourt Bioscience Corporation, 2017)	24
Abbildung 6: Gelelektrophorese von Produkten des NRAS Exon 3	32
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms mit Nachweis einer Mosaik-Mutation in NRAS c.181C>A, p. Gln61Lys	33
Abbildung 8: Klinische Befunde und MRT einer 2-jährigen Patientin mit CMNS und ECCL	41
Tabelle 1: Mutationsübersicht ausgewählter Mosaik-RASopathien	14
Tabelle 2: Reaktionsansatz der PCR	19
Tabelle 3: Reaktionsprotokoll der PCR	19
Tabelle 4: Primer und Referenzsequenzen	20
Tabelle 5: Reaktionsansatz der Sequenzierung	23
Tabelle 6: Reaktionsprotokoll der Sequenzierung	23
Tabelle 7: Untersuchte Gene der NGS-Diagnostik	App.
Tabelle 8: CMN mit gesicherter NRAS-Mutation	34
Tabelle 9: CMN mit gesicherter BRAF-Mutation	34/35
Tabelle 10: CMN mit Varianten der Detektionsklasse 2a	35
Tabelle 11: CMN mit Varianten der Detektionsklasse 3c	36

Tabelle 12: CMN mit multiplen Kandidatenmutationen	36
Tabelle 13: Ergebnisse der Mutationsanalysen der EN	37/38
Tabelle 14: Ergebnisse der Mutationsanalysen der SGH	39
Tabelle 15: Grad des Mosaiks der NRAS-Mutation in den untersuchten Geweben	42
Tabelle 16: Mutationsanalyse MM auf CMN (Probenpaar 1)	43
Tabelle 17: Mutationsanalyse MM auf CMN (Probenpaar 2)	43
Tabelle 18: MIM-Nummern der beschriebene Gene	App.

Literaturverzeichnis

1. Agencourt Bioscience Corp (Hg.) (2013): *AGENCOURT® AMPURE® XP. PCR Purification.* (o. J.).
- 2 Agencourt Bioscience Corp (Hg.) (2017): *AGENCOURT® CLEANSEQ®. Dye-Terminator Removal.* (o. J.).
3. Ahmed, I., Tope, W. D., Young, T. L., Miller, D. M., & Bloom, K. E. (2002). Neurocutaneous melanosis in association with encephalocraniocutaneous lipomatosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 47(2 Suppl), S196-200. <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.110073>
4. Ardinger, H. H., Horii, K. A., & Begleiter, M. L. (2007). Expanding the phenotype of oculocutaneous syndrome: Possible relationship to encephalocraniocutaneous lipomatosis. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(24), 2959–2962. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31969>
5. Barnhill, R. L., Cerroni, L., Cook, M., Elder, D. E., Kerl, H., LeBoit, P. E., McCarthy, S. W., Mihm, M. C., Mooi, W. J., Piepkorn, M. W., Prieto, V. G., & Scolyer, R. A. (2010). State of the art, nomenclature, and points of consensus and controversy concerning benign melanocytic lesions: Outcome of an international workshop. *Advances in Anatomic Pathology*, 17(2), 73–90. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181cfe758>
6. Bauer, J., Curtin, J. A., Pinkel, D., & Bastian, B. C. (2007). Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(1), 179–182. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700490>
7. Bennett, J. T., Tan, T. Y., Alcantara, D., Tétrault, M., Timms, A. E., Jensen, D., Collins, S., Nowaczyk, M. J. M., Lindhurst, M. J., Christensen, K. M., Braddock, S. R., Brandling-Bennett, H., Hennekam, R. C. M., Chung, B., Lehman, A., Su, J., Ng, S., Amor, D. J., University of Washington Center for Mendelian Genomics, ... McDonnell, L. M. (2016). Mosaic Activating Mutations in FGFR1 Cause Encephalocraniocutaneous Lipomatosis. *American Journal of Human Genetics*, 98(3), 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.02.006>
8. Berg, P., & Lindelöf, B. (2003). Congenital melanocytic naevi and cutaneous melanoma. *Melanoma Research*, 13(5), 441–445. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000056265.56735.3a>
Bett, B. J. (2006). Large or multiple congenital melanocytic nevi: Occurrence of neurocutaneous melanocytosis in 1008 persons. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(5), 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.10.040>
9. Boppudi, S., Bögershausen, N., Hove, H. B., Percin, E. F., Aslan, D., Dvorsky, R., Kayhan, G., Li, Y., Cursiefen, C., Tantcheva-Poor, I., Toft, P. B., Bartsch, O., Lisowski, C., Wieland, I., Jakubiczka, S., Wollnik, B., Ahmadian, M. R., Heindl, L. M., & Zenker, M. (2016). Specific mosaic KRAS mutations affecting codon 146 cause oculocutaneous syndrome and encephalocraniocutaneous lipomatosis. *Clinical Genetics*, 90(4), 334–342. <https://doi.org/10.1111/cge.12775>

10. Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Research*, 49(17), 4682–4689.
11. Chacon-Camacho, O. F., Lopez-Moreno, D., Morales-Sanchez, M. A., Hofmann, E., Pacheco-Quito, M., Wieland, I., Cortes-Gonzalez, V., Villanueva-Mendoza, C., Zenker, M., & Zenteno, J. C. (2019). Expansion of the phenotypic spectrum and description of molecular findings in a cohort of patients with oculocutaneous mosaic RASopathies. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(5), e625. <https://doi.org/10.1002/mgg3.625>
12. Chan, G. Z. P., Stevenson, L., Sinkar, S., & Lam, G. C. (2018). SCALP syndrome: What is it and its ophthalmic manifestations. *American Journal of Ophthalmology Case Reports*, 11, 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.ajoc.2018.04.018>
13. Charbel, C., Fontaine, R. H., Malouf, G. G., Picard, A., Kadlub, N., El-Murr, N., How-Kit, A., Su, X., Coulomb-L'Hermine, A., Tost, J., Mourah, S., Aractingi, S., & Guégan, S. (2014). NRAS mutation is the sole recurrent somatic mutation in large congenital melanocytic nevi. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(4), 1067–1074. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.429>
14. Cho, J., Kim, S. Y., Kim, Y. J., Sim, M. H., Kim, S. T., Kim, N. K. D., Kim, K., Park, W., Kim, J. H., Jang, K.-T., & Lee, J. (2017). Emergence of CTNNB1 mutation at acquired resistance to KIT inhibitor in metastatic melanoma. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 19(10), 1247–1252. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1662-x>
15. Etchevers, H. C., Rose, C., Kahle, B., Vorbringer, H., Fina, F., Heux, P., Berger, I., Schwarz, B., Zaffran, S., Macagno, N., & Krengel, S. (2018). Giant congenital melanocytic nevus with vascular malformation and epidermal cysts associated with a somatic activating mutation in BRAF. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 31(3), 437–441. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12685>
16. Feuerstein, R. C., & Mims, L. C. (1962). Linear nevus sebaceus with convulsions and mental retardation. *American Journal of Diseases of Children (1960)*, 104, 675–679. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1962.02080030675013>
17. Flosadóttir, E., & Bjarnason, B. (2008). A non-epidermolytic epidermal naevus of a soft, papillomatous type with transitional cell cancer of the bladder: A case report and a review of non-cutaneous cancers associated with the epidermal naevi. *Acta Dermato-Venereologica*, 88(2), 173–175. <https://doi.org/10.2340/00015555-0365>
18. Gao, C., Wang, Y., Broaddus, R., Sun, L., Xue, F., & Zhang, W. (2018). Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: A review. *Oncotarget*, 9(4), 5492–5508. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23695>
19. Gripp, K. W., Hopkins, E., Serrano, A., Leonard, N. J., Stabley, D. L., & Sol-Church, K. (2012). Transmission of the rare HRAS mutation (c. 173C > T; p.T58I) further illustrates its attenuated phenotype. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 158A(5), 1095–1101. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35294>
20. Gripp, K. W., & Lin, A. E. (2012). Costello syndrome: A Ras/mitogen activated protein

kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 14(3), 285–292. <https://doi.org/10.1038/gim.0b013e31822dd91f>

21. Groesser, L., Herschberger, E., Ruetten, A., Ruivenkamp, C., Lopriore, E., Zutt, M., Langmann, T., Singer, S., Klingseisen, L., Schneider-Brachert, W., Toll, A., Real, F. X., Landthaler, M., & Hafner, C. (2012). Postzygotic HRAS and KRAS mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning syndrome. *Nature Genetics*, 44(7), 783–787. <https://doi.org/10.1038/ng.2316>

22. Groesser, L., Singer, S., Peterhof, E., Landthaler, M., Heigl, U., Schneider-Brachert, W., Berneburg, M., & Hafner, C. (2016). KRAS, HRAS and EGFR Mutations in Sporadic Sebaceous Gland Hyperplasia. *Acta Dermato-Venereologica*, 96(6), 737–741. <https://doi.org/10.2340/00015555-2351>

23. Haberland, C., & Perou, M. (1970). Encephalocraniocutaneous lipomatosis. A new example of ectomesodermal dysgenesis. *Archives of Neurology*, 22(2), 144–155. <https://doi.org/10.1001/archneur.1970.00480200050005>

24. Hafner, C., & Groesser, L. (2013). Mosaic RASopathies. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(1), 43–50. <https://doi.org/10.4161/cc.23108>

25. Hafner, C., Hafner, H., & Groesser, L. (2014). Genetische Grundlagen seborrhoischer Keratosen und epidermaler Nävi. *Der Pathologe*, 35(5), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00292-014-1928-9>

26. Hafner, C., López-Knowles, E., Luis, N. M., Toll, A., Baselga, E., Fernández-Casado, A., Hernández, S., Ribé, A., Mentzel, T., Stoehr, R., Hofstaedter, F., Landthaler, M., Vogt, T., Pujol, R. M., Hartmann, A., & Real, F. X. (2007). Oncogenic PIK3CA mutations occur in epidermal nevi and seborrheic keratoses with a characteristic mutation pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13450–13454. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705218104>

27. Hafner, C., Toll, A., Gantner, S., Mauerer, A., Lurkin, I., Acquadro, F., Fernández-Casado, A., Zwarthoff, E. C., Dietmaier, W., Baselga, E., Parera, E., Vicente, A., Casanova, A., Cigudosa, J., Mentzel, T., Pujol, R. M., Landthaler, M., & Real, F. X. (2012). Keratinocytic epidermal nevi are associated with mosaic RAS mutations. *Journal of Medical Genetics*, 49(4), 249–253. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100637>

28. Hafner, C., Toll, A., & Real, F. X. (2011). HRAS mutation mosaicism causing urothelial cancer and epidermal nevus. *The New England Journal of Medicine*, 365(20), 1940–1942. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1109381>

29. Hafner, C., van Oers, J. M. M., Vogt, T., Landthaler, M., Stoehr, R., Blaszyk, H., Hofstaedter, F., Zwarthoff, E. C., & Hartmann, A. (2006). Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2201–2207. <https://doi.org/10.1172/JCI28163>

30. Hale, E. K., Stein, J., Ben-Porat, L., Panageas, K. S., Eichenbaum, M. S., Marghoob, A. A., Osman, I., Kopf, A. W., & Polsky, D. (2005). Association of melanoma and neurocutaneous melanocytosis with large congenital melanocytic naevi—results from the

NYU-LCMN registry. *British Journal of Dermatology*, 152(3), 512–517.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06316.x>

31. Happle, R. (1995). What is a nevus? A proposed definition of a common medical term. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 191(1), 1–5. <https://doi.org/10.1159/000246468>

32. Happle, R., & Küster, W. (1998). Nevus psiloliparus: A distinct fatty tissue nevus. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 197(1), 6–10. <https://doi.org/10.1159/000017968>

33. Heike, C. L., Cunningham, M. L., Steiner, R. D., Wenkert, D., Hornung, R. L., Gruss, J. S., Gannon, F. H., McAlister, W. H., Mumm, S., & Whyte, M. P. (2005). Skeletal changes in epidermal nevus syndrome: Does focal bone disease harbor clues concerning pathogenesis? *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 139A(2), 67–77.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30915>

34. Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., ... Chin, L. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150(2), 251–263.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>

35. Iacobelli, J., Harvey, N. T., & Wood, B. A. (2017). Sebaceous lesions of the skin. *Pathology*, 49(7), 688–697. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.08.012>

36. Idriss, M. H., & Elston, D. M. (2014). Secondary neoplasms associated with nevus sebaceus of Jadassohn: A study of 707 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(2), 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.10.004>

37. Insler, M. S., & Davlin, L. (1987). Ocular findings in linear sebaceous naevus syndrome. *The British Journal of Ophthalmology*, 71(4), 268–272. <https://doi.org/10.1136/bjo.71.4.268>

38. Jafry, M., & Sidbury, R. (2020). RASopathies. *Clinics in Dermatology*, 38(4), 455–461.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2020.03.010>

39. Jain, P., Chakrabarty, B., Kumar, A., Gupta, N., Kabra, M., & Gulati, S. (2014). Encephalocraniocutaneous lipomatosis with neurocutaneous melanosis. *Journal of Child Neurology*, 29(6), 846–849. <https://doi.org/10.1177/0883073813485432>

40. Jaqueti, G., Requena, L., & Sánchez Yus, E. (2000). Trichoblastoma is the most common neoplasm developed in nevus sebaceus of Jadassohn: A clinicopathologic study of a series of 155 cases. *The American Journal of Dermatopathology*, 22(2), 108–118.
<https://doi.org/10.1097/00000372-200004000-00004>

41. Kadonaga, J. N., & Frieden, I. J. (1991). Neurocutaneous melanosis: Definition and review of the literature. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 24(5 Pt 1), 747–755.

42. Kano, Y., Gebregiorgis, T., Marshall, C. B., Radulovich, N., Poon, B. P. K., St-Germain, J., Cook, J. D., Valencia-Sama, I., Grant, B. M. M., Herrera, S. G., Miao, J., Raught, B., Irwin, M. S., Lee, J. E., Yeh, J. J., Zhang, Z.-Y., Tsao, M.-S., Ikura, M., & Ohh, M.

(2019). Tyrosyl phosphorylation of KRAS stalls GTPase cycle via alteration of switch I and II conformation. *Nature Communications*, *10*(1), 224. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08115-8>

43. Kerick, M., Timmermann, B., & Schweiger, M.-R. (2010). Hochdurchsatz-Sequenzierung von gefrorenem und in Paraffin eingebettetem Tumor- und Normalgewebe. *Der Pathologe*, *31*(2), 255–257. <https://doi.org/10.1007/s00292-010-1377-z>

44. Kerr, B., Delrue, M.-A., Sigaudy, S., Perveen, R., Marche, M., Burgelin, I., Stef, M., Tang, B., Eden, O. B., O’Sullivan, J., De Sandre-Giovannoli, A., Reardon, W., Brewer, C., Bennett, C., Quarell, O., M’Cann, E., Donnai, D., Stewart, F., Hennekam, R., ... Black, G. (2006). Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases. *Journal of Medical Genetics*, *43*(5), 401–405. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.040352>

45. Kinsler, V. A., Chong, W. K., Aylett, S. E., & Atherton, D. J. (2008). Complications of congenital melanocytic naevi in children: Analysis of 16 years’ experience and clinical practice. *The British Journal of Dermatology*, *159*(4), 907–914. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08775.x>

46. Kinsler, V. A., O’Hare, P., Bulstrode, N., Calonje, J. E., Chong, W. K., Hargrave, D., Jacques, T., Lomas, D., Sebire, N. J., & Slater, O. (2017). Melanoma in congenital melanocytic naevi. *The British Journal of Dermatology*, *176*(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1111/bjd.15301>

47. Kinsler, V. A., Thomas, A. C., Ishida, M., Bulstrode, N. W., Loughlin, S., Hing, S., Chalker, J., McKenzie, K., Abu-Amero, S., Slater, O., Chanudet, E., Palmer, R., Morrogh, D., Stanier, P., Healy, E., Sebire, N. J., & Moore, G. E. (2013). Multiple congenital melanocytic nevi and neurocutaneous melanosis are caused by postzygotic mutations in codon 61 of NRAS. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*(9), 2229–2236. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.70>

48. Kinsler, V., Shaw, A. C., Merks, J. H., & Hennekam, R. C. (2012). The face in congenital melanocytic nevus syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *158A*(5), 1014–1019. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34217>

49. Krengel, S., Hauschild, A., & Schäfer, T. (2006). Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: A systematic review. *The British Journal of Dermatology*, *155*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07218.x>

50. Krengel, S., Scope, A., Dusza, S. W., Vonthein, R., & Marghoob, A. A. (2013). New recommendations for the categorization of cutaneous features of congenital melanocytic nevi. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *68*(3), 441–451. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.05.043>

51. Lam, J., Dohil, M. A., Eichenfield, L. F., & Cunningham, B. B. (2008). SCALP syndrome: Sebaceous nevus syndrome, CNS malformations, aplasia cutis congenita, limbal dermoid, and pigmented nevus (giant congenital melanocytic nevus) with neurocutaneous melanosis: a distinct syndromic entity. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *58*(5), 884–888. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.09.029>

52. Levinsohn, J. L., Tian, L. C., Boyden, L. M., McNiff, J. M., Narayan, D., Loring, E. S.,

- Yun, D., Sugarman, J. L., Overton, J. D., Mane, S. M., Lifton, R. P., Paller, A. S., Wagner, A. M., Antaya, R. J., & Choate, K. A. (2013). Whole-exome sequencing reveals somatic mutations in HRAS and KRAS, which cause nevus sebaceus. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*(3), 827–830. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.379>
53. Lian, C. G., Sholl, L. M., Zakka, L. R., O, T. M., Liu, C., Xu, S., Stanek, E., Garcia, E., Jia, Y., MacConaill, L. E., Murphy, G. F., Waner, M., & Mihm, M. C. (2014). Novel genetic mutations in a sporadic port-wine stain. *JAMA Dermatology*, *150*(12), 1336–1340. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.1244>
54. Lim, Y. H., Ovejero, D., Sugarman, J. S., Deklotz, C. M. C., Maruri, A., Eichenfield, L. F., Kelley, P. K., Jüppner, H., Gottschalk, M., Tiffit, C. J., Gafni, R. I., Boyce, A. M., Cowen, E. W., Bhattacharyya, N., Guthrie, L. C., Gahl, W. A., Golas, G., Loring, E. C., Overton, J. D., ... Choate, K. A. (2014). Multilineage somatic activating mutations in HRAS and NRAS cause mosaic cutaneous and skeletal lesions, elevated FGF23 and hypophosphatemia. *Human Molecular Genetics*, *23*(2), 397–407. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt429>
55. Luo, S., & Tsao, H. (2014). Epidermal, sebaceous, and melanocytic nevoid proliferations are spectrums of mosaic RASopathies. *The Journal of Investigative Dermatology*, *134*(10), 2493–2496. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.244>
56. Martins da Silva, V., Martinez-Barrios, E., Tell-Martí, G., Dabad, M., Carrera, C., Aguilera, P., Brualla, D., Esteve-Codina, A., Vicente, A., Puig, S., Puig-Butillé, J. A., & Malveyh, J. (2019). Genetic Abnormalities in Large to Giant Congenital Nevi: Beyond NRAS Mutations. *The Journal of Investigative Dermatology*, *139*(4), 900–908. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.045>
57. Moody, M. N., Landau, J. M., & Goldberg, L. H. (2012). Nevus sebaceus revisited. *Pediatric Dermatology*, *29*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2011.01562.x>
- Moog, U., Jones, M. C., Viskochil, D. H., Verloes, A., Van Allen, M. I., & Dobyns, W. B. (2007). Brain anomalies in encephalocraniocutaneous lipomatosis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *143A*(24), 2963–2972. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32074>
58. Neuhold, J. C., Friesenhahn, J., Gerdes, N., & Krengel, S. (2015). Case reports of fatal or metastasizing melanoma in children and adolescents: A systematic analysis of the literature. *Pediatric Dermatology*, *32*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/pde.12400>
59. Peacock, J. D., Dykema, K. J., Toriello, H. V., Mooney, M. R., Scholten, D. J., Winn, M. E., Borgman, A., Duesbery, N. S., Hiemenga, J. A., Liu, C., Campbell, S., Nickoloff, B. P., Williams, B. O., & Steensma, M. (2015). Oculoectodermal syndrome is a mosaic RASopathy associated with KRAS alterations. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *167*(7), 1429–1435. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37048>
60. Polubothu, S., McGuire, N., Al-Olabi, L., Baird, W., Bulstrode, N., Chalker, J., Josifova, D., Lomas, D., O'Hara, J., Ong, J., Rampling, D., Stadnik, P., Thomas, A., Wedgeworth, E., Sebire, N. J., & Kinsler, V. A. (2020). Does the gene matter? Genotype-phenotype and genotype-outcome associations in congenital melanocytic naevi. *The British Journal of Dermatology*, *182*(2), 434–443. <https://doi.org/10.1111/bjd.18106>
61. Qi, R.-Q., He, L., Zheng, S., Hong, Y., Ma, L., Zhang, S., Zhao, L., Guo, X., Wang, Y., Yu, J.-Y., Fu, L., Zhang, W., Long, T., Zhang, C., Chen, G., Lin, J., Wang, C., Zhou, L., Mi,

- Q., ... Gao, X.-H. (2011). BRAF exon 15 T1799A mutation is common in melanocytic nevi, but less prevalent in cutaneous malignant melanoma, in Chinese Han. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(5), 1129–1138. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.405>
62. QIAGEN® (Hg.) (2020): *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*. (o. J.).
63. Ramaswamy, V., Delaney, H., Haque, S., Marghoob, A., & Khakoo, Y. (2012). Spectrum of central nervous system abnormalities in neurocutaneous melanocytosis: CNS Abnormalities in Neurocutaneous Melanocytosis. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 54(6), 563–568. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2012.04275.x>
64. Ramesh, R., Shaw, N., Miles, E. K., Richard, B., Colmenero, I., & Moss, C. (2017). Mosaic NRAS Q61R mutation in a child with giant congenital melanocytic naevus, epidermal naevus syndrome and hypophosphataemic rickets. *Clinical and Experimental Dermatology*, 42(1), 75–79. <https://doi.org/10.1111/ced.12969>
65. Rauen, K. A. (2013). The RASopathies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14, 355–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153523>
66. Ritt, D. A., Monson, D. M., Specht, S. I., & Morrison, D. K. (2010). Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(3), 806–819. <https://doi.org/10.1128/MCB.00569-09>
67. Roh, M. R., Eliades, P., Gupta, S., & Tsao, H. (2015). Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28(6), 661–672. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12412>
68. Ruggieri, M., & Praticò, A. D. (2015). Mosaic Neurocutaneous Disorders and Their Causes. *Seminars in Pediatric Neurology*, 22(4), 207–233. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2015.11.001>
69. Salgado, C. M., Basu, D., Nikiforova, M., Bauer, B. S., Johnson, D., Rundell, V., Grunwaldt, L. J., & Reyes-Múgica, M. (2015). BRAF mutations are also associated with neurocutaneous melanocytosis and large/giant congenital melanocytic nevi. *Pediatric and Developmental Pathology: The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 18(1), 1–9. <https://doi.org/10.2350/14-10-1566-OA.1>
70. Salgado, C. M., Basu, D., Nikiforova, M., Hamilton, R. L., Gehris, R., Jakacki, R., Panigrahy, A., Yatsenko, S., & Reyes-Múgica, M. (2015). Amplification of mutated NRAS leading to congenital melanoma in neurocutaneous melanocytosis. *Melanoma Research*, 25(5), 453–460. <https://doi.org/10.1097/CMR.000000000000188>
71. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
72. Schimmelpenning, G. W. (1957). [Clinical contribution to symptomatology of phacomatosis]. *Fortschritte Auf Dem Gebiete Der Rontgenstrahlen Und Der Nuklearmedizin*, 87(6), 716–720.
73. Schubbert, S., Shannon, K., & Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 295–308.

<https://doi.org/10.1038/nrc2109>

74. Shih, F., Yip, S., McDonald, P. J., Chudley, A. E., & Del Bigio, M. R. (2014). Oncogenic codon 13 NRAS mutation in a primary mesenchymal brain neoplasm and nevus of a child with neurocutaneous melanosis. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, 140. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0140-8>
75. Shirley, M. D., Tang, H., Gallione, C. J., Baugher, J. D., Frelin, L. P., Cohen, B., North, P. E., Marchuk, D. A., Comi, A. M., & Pevsner, J. (2013). Sturge-Weber syndrome and port-wine stains caused by somatic mutation in GNAQ. *The New England Journal of Medicine*, 368(21), 1971–1979. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213507>
76. Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
77. Spranger, S., Bao, R., & Gajewski, T. F. (2015). Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*, 523(7559), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature14404>
78. Sun, B. K., Saggini, A., Sarin, K. Y., Kim, J., Benjamin, L., LeBoit, P. E., & Khavari, P. A. (2013). Mosaic activating RAS mutations in nevus sebaceus and nevus sebaceus syndrome. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 824–827. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.377>
79. Thatcher, J. D. (2010). The Ras-MAPK Signal Transduction Pathway. *Science Signaling*, 3(119), tr1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3119tr1>
80. Tidyman, W. E., & Rauen, K. A. (2009). The RASopathies: Developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(3), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.04.001>
81. Toll, A., Fernández, L. C., Pons, T., Groesser, L., Sagrera, A., Carrillo-de Santa Pau, E., Vicente, A., Baselga, E., Vázquez, M., Beltrán, S., Pisano, D. G., Rueda, D., Gut, M., Pujol, R. M., Hafner, C., Gut, I., Valencia, A., & Real, F. X. (2016). Somatic Embryonic FGFR2 Mutations in Keratinocytic Epidermal Nevi. *The Journal of Investigative Dermatology*, 136(8), 1718–1721. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.03.040>
82. Toriello, H. V., Lacassie, Y., Droste, P., & Higgins, J. V. (1993). Provisionally unique syndrome of ocular and ectodermal defects in two unrelated boys. *American Journal of Medical Genetics*, 45(6), 764–766. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320450620>
83. Ulrich, M., Tinschert, S., Siebert, E., Franke, I., Tüting, T., Ulrich, J., Schanze, D., Wieland, I., & Zenker, M. (2019). Detection of a multilineage mosaic NRAS mutation c.181C>A (p.Gln61Lys) in an individual with a complex congenital nevus syndrome. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 32(3), 470–473. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12761>
84. Vabres, P., Sorlin, A., Kholmanskikh, S. S., Demeer, B., St-Onge, J., Duffourd, Y., Kuentz, P., Courcet, J.-B., Carmignac, V., Garret, P., Bessis, D., Boute, O., Bron, A., Captier, G., Carmi, E., Devauchelle, B., Geneviève, D., Gondry-Jouet, C., Guibaud, L., ... Rivière, J.-B. (2019). Postzygotic inactivating mutations of RHOA cause a mosaic neuroectodermal syndrome. *Nature Genetics*, 51(10), 1438–1441. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0498-4>

85. van de Warrenburg, B. P., van Gulik, S., Renier, W. O., Lammens, M., & Doelman, J. C. (1998). The linear naevus sebaceus syndrome. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *100*(2), 126–132. [https://doi.org/10.1016/s0303-8467\(98\)00012-2](https://doi.org/10.1016/s0303-8467(98)00012-2)
86. Wu, J., Rosenbaum, E., Begum, S., & Westra, W. H. (2007). Distribution of BRAF T1799A(V600E) mutations across various types of benign nevi: Implications for melanocytic tumorigenesis. *The American Journal of Dermatopathology*, *29*(6), 534–537. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181584950>
87. Xia, J., Jia, P., Hutchinson, K. E., Dahlman, K. B., Johnson, D., Sosman, J., Pao, W., & Zhao, Z. (2014). A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: A road map for the study of genes with potential clinical relevance. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(7), 1918–1928. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0804>
88. Yeh, I., Lang, U. E., Durieux, E., Tee, M. K., Jorapur, A., Shain, A. H., Haddad, V., Pissaloux, D., Chen, X., Cerroni, L., Judson, R. L., LeBoit, P. E., McCalmont, T. H., Bastian, B. C., & de la Fouchardière, A. (2017). Combined activation of MAP kinase pathway and β -catenin signaling cause deep penetrating nevi. *Nature Communications*, *8*(1), 644. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00758-3>
89. Zenker, M., & Kutsche, K. (2016). RASopathien. *medizinische genetik*, *28*(1), 15–38. <https://doi.org/10.1007/s11825-016-0080-8>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Martin Zenker, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme im Institut für Humangenetik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Wieland, auf deren Hilfsbereitschaft und fachliche Kompetenz ich jederzeit bauen konnte. Die zahlreichen Gespräche auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene werden mir als bereichernde Elemente für meinen weiteren Lebensweg in Erinnerung bleiben.

Daneben gilt mein Dank dem gesamten medizinischen Assistenzpersonal des Instituts für Humangenetik, insbesondere Susann Engelberg und Nicole Epperlein, ohne die die Durchführung und Fertigstellung der Experimente um ein Vielfaches schwerer geworden wären.

Ein herausragender Dank gilt meinem Papa, Prof. Dr. Jens Ulrich, der mich bei der Bewältigung sowohl wissenschaftlicher als auch privater Probleme immer unterstützt hat. Ohne seine mahnenden Worte würde diese Dissertation heute wahrscheinlich noch in ihren Kinderschuhen stecken. Zusammen mit meiner Mama, Dr. Anne-Katrin Ulrich, und der ganzen Familie hat er mich geprägt und meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Verlobten Marlene für Ihre Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Mutationen von Genen des RAS-MAPK-Signalweges in kongenitalen Nävi

im Institut für Humangenetik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. Martin Zenker, Prof. Dr. Ilse Wieland sowie Prof. Dr. Jens Ulrich

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Maximilian Ulrich
Anschrift: Methfesselstraße 38a
10965 Berlin
Geburtsdatum/-ort: 19.05.1994 in Magdeburg

Schulbildung

2000 – 2004 Grundschole Diesdorf, Magdeburg
2004 - 2012 Ökumenisches Domgymnasium Magdeburg

Hochschulausbildung

10/2013 – 03/2021 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke
Universität Magdeburg
09/2015 1. Staatsexamen (Note gut)
10/2019 2. Staatsexamen schriftlicher Teil (Note gut)
11/2019-10/2020 Praktisches Jahr in Berlin und Magdeburg
12/2020 2. Staatsexamen mündlicher Teil (Note sehr gut)

Berufsleben

Seit 04/2021 Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin I am
Helios-Klinikum Emil-von-Behring Berlin-Zehlendorf

Magdeburg, den

Appendix:

Tabelle 7: Untersuchte Gene der NGS-Diagnostik

Zielgene_Exon	Chromosom	Startkoordinaten	Stopkoordinaten
AKT1_E03	14	105246426	105246556
ALK_E23	2	29443645	29443704
ALK_E24	2	29436845	29436950
ALK_E25	2	29432646	29432747
BRAF_E11	7	140481373	140481496
BRAF_E11	7	140481373	140481496
BRAF_e15	7	140453090	140453196
CREBBP_E26	16	3788557	3788676
CREBBP_E26	16	3788557	3788676
CREBBP_E27	16	3786694	3786819
CTNNB1_E03	3	41266015	41266246
CTNNB1_E03	3	41266015	41266246
DICER1_E25	14	95560443	95560496
DICER1_E26	14	95557607	95557663
DUSP5_E13	10	112262517	112262564
EGFR_E03	7	55211069	55211184
EGFR_E07	7	55221765	55221848
EGFR_E15	7	55233016	55233133
EGFR_E18	7	55241646	55241739
EGFR_E19	7	55242412	55242516
EGFR_E20	7	55248983	55249174
EGFR_E20	7	55248983	55249174
EGFR_E21	7	55259483	55259570
EP300_26	22	41565503	41565623
EP300_26	22	41565503	41565623
EP300_27	22	41566357	41566578
EP300_27	22	41566357	41566578
EP300_28	22	41568475	41568670
EP300_28	22	41568475	41568670
EP300_29	22	41569624	41569667
FGFR1_E03	8	38285861	38285956
FGFR1_E07	8	38282144	38282220
FGFR1_E12	8	38274820	38274868
FGFR1_E14	8	38272274	38272330
FGFR2_E07	10	123279490	123279686
FGFR2_E07	10	123279490	123279686
FGFR2_E09	10	123274730	123274836
FGFR2_E12	10	123258006	123258122
FGFR2_E14	10	123247502	123247544
FGFR3_E07	4	1803559	1803682
FGFR3_E07	4	1803559	1803682

FGFR3_E09	4	1806088	1806224
FGFR3_E09	4	1806088	1806224
FGFR3_E12	4	1807300	1807398
FGFR3_E14_E15	4	1807777	1807901
FGFR3_E14_E15	4	1807777	1807901
FGFR3_E16	4	1808292	1808413
FGFR3_E18	4	1808918	1809004
FLT3_E11	13	28610072	28610182
FLT3_e14_e15	13	28607987	28608354
FLT3_e14_e15	13	28607987	28608354
FLT3_e14_e15	13	28607987	28608354
FLT3_E16	13	28602322	28602427
FLT3_e20	13	28592605	28592717
GNA11_E04	19	3114939	3115073
GNA11_E05	19	3118919	3118992
GNA11_E06	19	3119230	3119360
GNA11_E07	19	3120984	3121180
GNA11_E07	19	3120984	3121180
GNA14_E04	9	80046262	80046294
GNA14_E05	9	80043914	80043946
GNAQ_E02	9	80537074	80537127
GNAQ_E04	9	80412433	80412564
GNAQ_E05	9	80409376	80409511
GNAQ_E05	9	80409376	80409511
GNAQ_E06	9	80343427	80343586
GNAQ_E06	9	80343427	80343586
GNAQ_E07	9	80336239	80336432
GNAQ_E07	9	80336239	80336432
GNAS_E08_GNAS_E09	20	57484402	57484637
GNAS_E08_GNAS_E09	20	57484402	57484637
HRAS_E02	11	533840	533947
HRAS_E03	11	534238	534325
HRAS_E04	11	533450	533615
HRAS_E04	11	533450	533615
IDH1_e4	2	209113092	209113195
IDH2_E04	15	90631816	90631982
IDH2_E04	15	90631816	90631982
JAK2_e12 + JAK2_E11 Merged	9	5069922	5070056
JAK2_e12 + JAK2_E11 Merged	9	5069922	5070056
JAK2_E13 + JAK2_14 Merged	9	5073728	5073788
KDR_E07	4	55979545	55979579
KDR_E08	4	55976841	55976888
KDR_E11	4	55972952	55972983
KDR_E16	4	55964857	55964971

KDR_E21	4	55961080	55961121
KDR_E23	4	55956182	55956239
KDR_E26	4	55955035	55955121
KIT_E02	4	55561682	55561916
KIT_E02	4	55561682	55561916
KIT_E09	4	55592020	55592222
KIT_E09	4	55592020	55592222
KIT_E10 KIT_E10-11 KIT_e11	4	55593572	55593713
KIT_E10 KIT_E10-11 KIT_e11	4	55593572	55593713
KIT_E10 KIT_E10-11 KIT_e11	4	55593362	55593372
KIT_E13	4	55594183	55594290
KIT_E14	4	55595498	55595654
KIT_E14	4	55595498	55595654
KIT_E15	4	55597491	55597588
KIT_e17	4	55599287	55599361
KIT_E18	4	55602663	55602778
KRAS_E02	12	25398255	25398319
KRAS_E03	12	25380242	25380349
KRAS_E04	12	25378537	25378724
KRAS_E04	12	25378537	25378724
MAP2K1_E03	15	66729145	66729188
MAPK1_E07	22	22127155	22127185
MTOR_E30	1	11217220	11217339
MTOR_E39	1	11190781	11190834
MTOR_E43	1	11188057	11188184
MTOR_E43	1	11188057	11188184
MTOR_E47	1	11184551	11184602
MTOR_E53	1	11174376	11174444
MYC_E02	8	128750646	128750768
MYCN_E02	2	16082299	16082327
NOTCH1_E26	9	139399119	139399485
NOTCH1_E26	9	139399119	139399485
NOTCH1_E26	9	139399119	139399485
NOTCH1_E27	9	139397631	139397782
NOTCH1_E27	9	139397631	139397782
NOTCH1_E28	9	139396909	139396942
NRAS_E02	1	115258680	115258784
NRAS_E03	1	115256420	115256602
NRAS_E03	1	115256420	115256602
NRAS_E04	1	115252185	115252355
NRAS_E04	1	115252185	115252355
PIK3CA_E02	3	178916862	178916968
PIK3CA_E05	3	178921522	178921580
PIK3CA_E08	3	178927974	178928075

PIK3CA_E08	3	178927974	178928075
PIK3CA_E10	3	178936041	178936125
PIK3CA_E14	3	178938829	178938948
PIK3CA_E21	3	178951877	178952152
PIK3CA_E21	3	178951877	178952152
PIK3CA_E21	3	178951877	178952152
PIK3R1_E02	5	67522703	67522737
PIK3R1_E02	5	67589127	67589160
PIK3R1_E02	5	67589562	67589669
PIK3R1_E02	5	67591062	67591160
PIK3R1_E02	5	67591062	67591160
PIK3R2_E09	19	18273774	18273800
PLCG1_E01	20	39766410	39766435
PLCG1_E11	20	39792569	39792594
PLCG1_E18	20	39795217	39795239
PLCG1_E29	20	39802375	39802397
RET_E10	10	43609014	43609123
RET_E11	10	43609925	43610043
RET_E13	10	43613818	43613931
RET_E15	10	43615530	43615654
RET_E16	10	43617381	43617467
RHOA_E02 Merged	3	49412873	49412987
RHOA_E03	3	49405865	49405982
RRAS_E01	19	50143220	50143259
RRAS_E03	19	50140145	50140183
RRAS2_E01	11	14380321	14380358
RRAS2_E03	11	14316374	14316412
SMAD4_E03	18	48575128	48575301
SMAD4_E03	18	48575128	48575301
SMAD4_E05	18	48581071	48581366
SMAD4_E05	18	48581071	48581366
SMAD4_E06	18	48584525	48584714
SMAD4_E06	18	48584525	48584714
SMAD4_E08	18	48586231	48586416
SMAD4_E08	18	48586231	48586416
SMAD4_E08	18	48586231	48586416
SMAD4_E09	18	48591793	48591982
SMAD4_E09	18	48591793	48591982
SMAD4_E10	18	48593374	48593547
SMAD4_E10	18	48593374	48593547
SMAD4_E10	18	48593374	48593547
SMAD4_E11	18	48602995	48603168
SMAD4_E11	18	48602995	48603168
SMAD4_E12	18	48604635	48604808
SMAD4_E12	18	48604635	48604808
SMO_E01	7	128828990	128829326

SMO_E01	7	128828990	128829326
SMO_E01	7	128828990	128829326
SMO_E02	7	128843222	128843433
SMO_E02	7	128843222	128843433
SMO_E03	7	128845041	128845256
SMO_E03	7	128845041	128845256
SMO_E04	7	128845448	128845626
SMO_E04	7	128845448	128845626
SMO_E05 SMO_E06	7	128845988	128846431
SMO_E05 SMO_E06	7	128845988	128846431
SMO_E05 SMO_E06	7	128845988	128846431
SMO_E05 SMO_E06	7	128845988	128846431
SMO_E07	7	128848597	128848695
SMO_E08	7	128849127	128849241
SMO_E09	7	128850201	128850392
SMO_E09	7	128850201	128850392
SMO_E10	7	128850803	128850957
SMO_E10	7	128850803	128850957
SMO_E11	7	128851474	128851614
SMO_E11	7	128851474	128851614
SMO_E12	7	128851862	128852292
SMO_E12	7	128851862	128852292
SMO_E12	7	128851862	128852292
SMO_E12	7	128851862	128852292
STAT3_E21	17	40474401	40474513

Tabelle 18: MIM-Nummern der beschriebene Gene

Gen	MIM-Nummer
BRAF	*164757
DICER1	*606241
EGFR	*131550
FGFR2	*176943
FGFR3	*134934
GNAQ	*600998
GNAS	*139320
HRAS	*190020
JAK2	*147796
KIT	*164920
KRAS	*190070
MTOR	*601231
NRAS	*164790
PIK3CA	*171834
RHOA	*165390
SMAD4	*600993
TERT	*187270