

REKVISISJON: MUTASJONSANALYSER VED AVANSERT MALIGNT MELANOM

Kartlegging av somatiske mutasjoner i *BRAF*, *NRAS* og *KIT* er nødvendig for kategorisering og behandling av pasienter med avanserte stadier (III/IV) av malignt melanom. Ved MolPat har det til nå vært etablert et tilbud for analyse av *BRAF*, *NRAS* og *c-KIT* hver for seg. Disse ønsker vi nå å samle i en pakke dedikert til denne sykdomsgruppen (tilsvarende for hva vi har for metastaserende CRC). Dette fordi:

- Vi regner med at stadig ny kunnskap/nye kliniske studier vil generere behov for nye markører. En pakkeløsning som fortløpende justeres/oppgraderes vil derfor være mer hensiktsmessig
- Pakkene gis versjonsnummer, eventuelt dato for siste revisjon
- Inntil laboratoriet får implementert løsninger for nestegenerasjons-(NGS)-analyse gjøres analyse suksessivt etter rekkefølgen *BRAF* – *NRAS* – *KIT*. Trippelnegative vurderes i samråd med rekvirent for *KRAS* analyse
- Ved positiv test utføres ikke analyse av de gjenværende markørene om ikke dette er angitt spesielt (kan være aktuelt ved mistanke om behandlingsgenerert resistens → alternativ behandling)
- Resultatene av onkogen analysene besvares på samme remissennummer dersom analysegrunnet er DNA isolert fra en og samme tumor

BAKGRUNN

Pasienter med malignt melanom (stadium III/IV) responderer dårlig på de vanligste formene for kjemoterapi. Forventet levetid er mindre enn 5 år for flertallet (~ 90 %) av pasientene. De dårlige utsiktene gjør alternative terapeutiske strategier helt nødvendig. Lovende resultat er oppnådd ved behandling rettet mot onkogener som er aktivert ved mutasjoner i bestemte kodon. Slike mutasjoner er vanlige ved malignt melanom. Mer enn halvparten har aktiverende mutasjoner i *BRAF* der mutasjoner i kodon 600 dominerer (se nedenfor). Slike mutasjoner bidrar til mer enn 500 ganger økning i kinase-aktivitet i forhold til normal *BRAF* aktivitet når målt ved nedstrøms MAPK/ERK ekspresjon. Resultatet er økt celleproliferasjon sammen med reduserte muligheter for programmert celledød (apoptose). Tapt evne til å gå i apoptose kan være noe av forklaringen på hvorfor denne pasientgruppen responderer dårlig på tradisjonell terapi som nettopp har til hensikt å indusere apoptose. Pasienter med maligne melanom som er positiv for *BRAF* V600E/K mutasjon responderer godt på *Vemurafenib* og *Dabrafenib* som er lavmolekylære kinase-inhibitorer rettet spesifikt mot mutert *BRAF* (V→E/K). Resultatet er bedret progresjonsfri og total overlevelse. Noe av rasjonale bak målrettet behandling er å skåne nabo- og normalceller uten mutasjon for utilsiktet stopp i cellesyklus og induksjon av apoptose.

I tillegg til mutasjoner i *BRAF*, er det kjent at også mutasjoner i *NRAS* resulterer i aktivering av MAPK/ERK-nettverket i omkring 20 % av pasientene med malignt melanom. Disse karakteriseres ofte ved å være noe tykkere og ved høyere mitoseaktivitet enn *BRAF* positive melanom. Majoriteten av *NRAS* mutasjonene påvises i kodon 61. Ved siden av å stimulere MAPK/ERK på tilsvarende måte som *BRAF*-kodon 600 mutasjoner, aktiverer *NRAS* også det regulatoriske PI3K/AKT-nettverket – også involvert i celleproliferasjon, differensiering og regulering av apoptose. Fordi mutasjoner i *BRAF* og *NRAS* i hovedsak er gjensidig ekskluderende, representer disse samlet mer enn 70 % av identifiserbar onkogen aktivering i maligne melanom. Melanom lokalisert i slimhinner, distalt på ekstremiteter (under negler på fingre og tær), eller på

hudområder med solskade, har sjeldent mutasjoner i verken *BRAF* eller *NRAS*, men snarere i *KIT* som er en trans-membran kinase-reseptor. Som *BRAF* og *NRAS*, er også *KIT* funksjonelt koblet til MAPK/ERK nettverket – forenlig med en sentral rolle for dette nettverket i utvikling av melanom. Analyse av *KIT* i selekterte grupper av melanom pasienter - angis av rekvirent - er helt nødvendig.

Flere konstitutivt aktive netterverk, som blant annet er tilfelle ved aktiverende *NRAS* mutasjoner, åpner for nye potensielle aktører (for eksempel MEK) som mål for behandling. Et dedikert markørpanel som del av en pakke må derfor være dynamisk og fort kunne tilpasses nye diagnostiske behov.

***BRAF*, *NRAS*, og *KIT* onkogen-analyser: Relevans for individtilpasset behandling av melanom (stadium III/IV)**

BRAF

Relevans: Respons på målrettet (i.e. *vemurafenib* og *dabrafenib*) behandling. Grunnlag for seleksjon.

Mutasjonsfrekvens¹⁾: Ca 50 %

Aktuelle mutasjoner: Ekson 15: Kodon 594 og 600

Mutasjonsspekter/frekvens:

Kodon 600: Val600Glu (V600E; 88 %), deretter Val600Lys (V600K; 10 %), fulgt av mindre enn 1 % for Val600Arg (V600R), Val600Met (V600M), og Val600Asp (V600D)
Kodon 594: Asp594Asn (D594N) (< 0.5 %).

NRAS

Relevans:

1) identifisere pasienter til målrettet behandling (f. eks. MEK-inhibitorer ev. i kombinasjon med cyklin-kinase-inhibitorer).

2) Aktiverende mutasjoner i *NRAS* kan "sabotere" effekten av terapi rettet mot *BRAF*.

3) Kunnskap om *NRAS* status vil være aktuell for 2. linje, selektiv behandling når pasienten ikke responderer på *BRAF* dirigert terapi (som følge av terapeutisk induisert resistens).

Mutasjonsfrekvens¹⁾: Ca 20 %

Aktuelle mutasjoner: Ekson 1: kodon 12 og 13; Ekson 2: Kodon 60 og 61

Mutasjonsspekter: Domineres av mutasjoner (aminosyre substitusjoner) i kodon 60-61 (ca 82 %) (ekson 2). Mest vanlig er Glu61Arg (Q61R), Glu61Lys (Q61K), Glu61Leu (Q61L), Glu61His (Q61H), men også mutasjoner i kodon 12 og 13 er påvist og av prediktiv betydning.

KIT

Relevans: *KIT* mutasjoner primært å finne i melanom lokalisert distalt på ekstremiteter som håndflater-fotsåler/under negler, etc. (~ 20 %), i slimhinner (~ 16 %), eller i melanom skadet av soling. Utgjør ca 5 % av alle melanomer. Kan vurderes for terapi med imatinib (hemmer av *KIT*)

Mutasjonsfrekvens¹⁾: 2- 20 %

Aktuelle mutasjoner – ekson/kodon: Ekson 11: kodon 557, 558, 559 og 576; Ekson 17; kodon 822 og 823

Mutasjonsspekter:

Ekson 11: Trp557Arg (W557R), Lys558Asn (K558N), Val559Ala/Asp (V559A/D), Leu576Pro (L576P)

Ekson 17: Asn822Lys (N822K), Tyr823Asp (Y823D).

- Andre typer mutasjoner som insersjoner/duplikasjoner, delesjoner, gen-amplifisering forekommer

- Synes å være en overvekt av mutasjoner i kodon 576 (30 – 35 %)

¹⁾ Varierer avheng av type melanom/lokalisasjon, regionale vs distale metastaser og metode for analyse.

Aspekt ved onkogen-dirigert behandling – behandlingrefraktære tumorer:

- Økt kopiantall av *BRAF* er blant foreslåtte mekanismer for økt kinaseaktivitet og utvikling av resistens
- Nye mutasjoner i *BRAF* genet eller oppregulering/aktivering av andre regulatoriske nettverk (e.g. *PDGF* or *NRAS*) som følge av mutasjoner (ikke godt kartlagt)
- *BRAF* mRNA finnes som alternative transkript i både melanom og CRC – og noen spleise-varianter er funnet *Vemurafenib*-resistente
- *BRAF* og *NRAS* mutasjoner ikke gjensidig ekskluderende (observert i 0.6 % av melanom i hud)
- Tap av tumor suppressorgenet *PTEN* (chr. 10q23-LOH)
- 30 % av pasienter med avansert melanom sykdom (Stadium IV) har ikke-identifiserbare mutasjoner som kan være årsak manglende respons på mutasjonsspesifikke tumorer

REFERANSER

Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 2008;14:6821-8

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353:2135-47

Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma, *J Clin Oncol* 2006;24:4340-6

Ekedahl H, Cirenajwis H, Harbst K, Carneiro A, Nielsen K, Olsson H, Lundgren L, Ingvar C, Jönsson G. The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br J Dermatol* 2013;169:1049-55

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012;367:107-14

Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 2012;118:4014-23

Ponti G, Pellacani G, Tomasi A, et al. The somatic affairs of BRAF: tailored therapies for advanced malignant melanoma and orphan non-V600E (V600R-M) mutations. *J Clin Pathol* 2013;66:441-5

Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012;366:707-14

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116:855-67