

03.07.2023

**Ergebnisbericht****„Molekulare Mechanismen der frühen Melanomentstehung und daraus resultierende neue Therapieansätze“****1. Allgemeine Angaben:**

Gefördert durch die:

Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen

Geschäftsführung

Naumannstr. 8

01309 Dresden

**Titel:** „Molekulare Mechanismen der frühen Melanomentstehung und daraus resultierende neue Therapieansätze“**Kurzbezeichnung:** Mechanismen der frühen Melanomentstehung**Fördernummer:** 3/20**Laufzeit:** 1.10.2020-30.6.2023**Antragsteller:** Prof. Dr. med. Jan C. Simon, Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universität Leipzig, Philipp-Rosenthal-Str. 23, 04103 Leipzig, E-Mail ariane.conrad@medizin.uni-leipzig.de, Tel.: 0341-9718600**Mitantragsteller:** Prof. Dr. med. M. Kunz, Oberarzt der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universität Leipzig, Philipp-Rosenthal-Str. 23, 04103 Leipzig, E-Mail manfred.kunz@medizin.uni-leipzig.de, Tel.: 0341-9718610**2. Ergebnisse:****Zusammenfassung des Ergebnisberichts**

Das maligne Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist ein bösartiger Hautkrebs, der aus veränderten Pigmentzellen (Melanozyten) der Haut und der Schleimhäute entsteht. Eine zunehmende Inzidenz und frühe Absiedlung (Metastasierung) in entfernte Organe verursachen eine hohe Sterblichkeit. Die Entstehung und das Fortschreiten der Hautmelanome sind schrittweise Prozesse, die mit einer Lösung der bösartigen Melanomzellen aus dem Verbund mit den Zellen der obersten Hautschicht (Keratinozyten) beginnt. Ohne einen Verlust der Verbindung mit Keratinozyten und der Kontrolle der Melanomzellen durch die Keratinozyten, kann keine Einwanderung in den Körper und keine Metastasierung erfolgen. Im vorliegenden Projekt sind wir der Rolle der Keratinozyten-Melanom-Interaktion für die Melanomentstehung genauer nachgegangen und haben dabei moderne Analyseverfahren wie z.B. das *next-generation sequencing* angewendet.

In einem zuvor abgeschlossenen Projekt hatten wir bereits Kandidatengene in Keratinozyten identifiziert, die an dieser Interaktion beteiligt sind, die jetzt einer weiteren Bestätigung bedurften. Wir haben dabei auf das Gen *FAT1* fokussiert, einem atypischen Cadherin Gen. Bei den nachgewiesenen Mutationen im *FAT1* Gen in Melanom-assoziierten Keratinozyten handelte es sich in allen Fällen um inaktivierende Mutationen. Grundsätzlich sind Cadherin Gene für den Zell-Zell-Kontakt wichtig. In einer Serie neuer Melanompräparate wurde die Epidermis mittels Makrodissektion von den Melanomzellen getrennt und die auffälligen Regionen des *FAT1* Genes mittels *next-generation sequencing* untersucht. Im Wesentlichen konnten wir dabei die Voruntersuchungen bestätigen. Wir schlossen dann umfangreiche funktionelle Untersuchungen mittels *live-cell imaging* an. Hier wurde

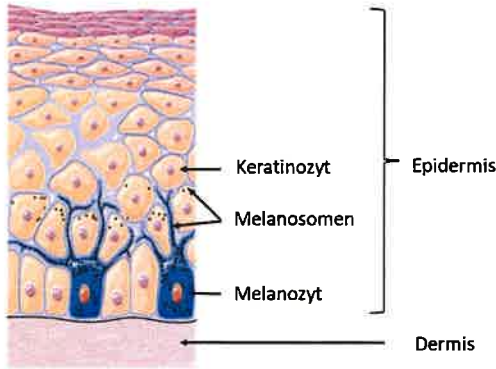
*FAT1* in Keratinozyten durch einen sog. Knockdown inaktiviert und der Einfluss des Knockdowns auf den Wundverschluss in der Zellkultur mittels Scratch-Test untersucht. Tatsächlich kam es durch den Knockdown zu einem schnelleren Wundverschluss durch die Melanomzellen, was die höhere Migrations- und Invasionsbereitschaft der Melanomzellen unter *FAT1* Knockdown in Keratinozyten belegt. Um den Einfluss des *FAT1* Genes in Keratinozyten auf die Expression aller Gene in Melanomzellen zu untersuchen, wurden wiederum Keratinozyten und Melanomzellen ko-kultiviert, die mRNA aus beiden Zelltypen isoliert und die Expression der Gene in der Ko-Kultur untersucht. Dabei kam es in Melanomzellen zu einer Hochregulation bestimmter Gene. Leider war der Knockout in den Keratinozyten hier nicht stark genug, um *FAT1*-spezifische Effekte zu identifizieren. Wir fanden aber, dass Keratinozyten einen erheblichen Einfluss auf die Genexpression in Melanomzellen haben.

Zusammenfassend konnten wir eine Reihe von Mutationen im *FAT1* Gen in Melanom-assoziierten Keratinozyten nachweisen und die Bedeutung von *FAT1* bei der Interaktion von Keratinozyten mit Melanomzellen bestätigen. Durch diese Untersuchungen konnte ein neuer Mechanismus der Melanomentstehung aufgedeckt werden. Zukünftige pharmakologische Studien könnten hier neue therapeutische Perspektiven eröffnen.

### 3. Ausgangssituation

Das maligne Melanom, dessen Ursprung die melaninproduzierenden Zellen (Melanozyten) der Haut sind, stellt die aggressivste und schnell metastasierendste Art von Hautkrebs dar. In direkter Verbindung zu den Melanozyten stehen die Keratinozyten, welche über eine direkte Zell-Zell-Verbindung und Sekretion von Substanzen Einfluss auf das Wachstum der Melanozyten und Melanomzellen haben (**Abbildung 1**). In jüngeren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass z.B. Polaritätsproteine, Keratin-bindende Proteine und Zelladhäsionsproteine der Keratinozyten einen Einfluss auf die Proliferation, die Motilität und Invasivität von Melanozyten und Melanomzellen haben und damit einen Einfluss auf die Melanomentstehung und Melanomprogression ausüben (**Mescher et al., 2017, Arnette et al., 2019**). Bisher gab es jedoch noch keine Untersuchungen an humanen Melanomproben, welche sich explizit den umgebenden Zellen (Keratinozyten) gewidmet haben, um diese umfassend und detailliert zu untersuchen. Ziel des vorliegenden Projektes war die Aufklärung der funktionellen Bedeutung genetischer Veränderungen in Melanom-assoziierten Keratinozyten, welche zur initialen Melanomentstehung beitragen können. Darauf aufbauend kann durch eine Interferenz mit den aktivierten Signalwegen in Melanomzellen Melanomwachstum und Metastasierung wirksam bekämpft werden.

Nach weiterer Validierung der identifizierten somatischen Varianten in Keratinozytengenomen im vorliegenden Projekt sollte dann deren Einfluss auf die Interaktion von Keratinozyten mit Melanomzellen untersucht werden. Hierzu sollten in Ko-Kulturexperimenten spezifische Mutanten generiert und die molekularen Vorgänge in Keratinozyten und Melanomzellen untersucht werden. Zur Analyse der Melanomzellen wurden Proliferation und Migration im *live-cell imaging* untersucht. In einem therapeutischen Ansatz sollten dann so genannte *small molecules* (kleine molekulare Inhibitoren) auf ihre inhibitorischen Effekte in diesem System getestet werden.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Dermis und Epidermis mit Melanozyten.** Die Epidermis besteht aus mehreren Schichten von Keratinozyten verschiedener Differenzierungsstufen. Die Melanozyten, als Vorläufer der Melanomzellen, befinden sich in der Basalzellschicht der Epidermis und sind von undifferenzierten Keratinozyten umgeben.

#### 4. Zielsetzung des Projektes und Arbeitspakete

Die folgenden Ziele sollten verfolgt werden:

##### 4.1 Validierung der bereits identifizierten somatischen Mutationen in Melanom-assoziierten Keratinozyten in einem größeren unabhängigen Probenstet

In den bisherigen Vorarbeiten konnten Gene mit somatischen Varianten in Melanom-assoziierten Keratinozyten bei 18 Melanompatienten identifiziert werden. Diese Daten sollten in einer weiteren Kohorte von Melanompatienten mittels Einzelgensequenzierung validiert werden. In **Tabelle 1** sind die identifizierten genetischen Varianten aufgrund der Exomsequenzierung von Laser-mikrodissezierter Epidermis von primären Melanomen aufgelistet. Dabei handelt es sich in der Regel um Missense Varianten im *FAT1*, *PLXNA4*, *KIF21B* und *MGAM2* Gen. Diese Liste wurde durch eine Reihe weiterer Versuche gegenüber der Liste aus dem ursprünglichen Antrag überarbeitet. Unser besonderes Interesse richtete sich auf *FAT1*, FAT Atypical Cadherin 1, einem Homolog das Drosophila *fat* Genes. Dieses Gen wird in Epithelien exprimiert und gilt grundsätzlich als Tumorsuppressor. Es wurde auch im Zusammenhang mit epithelial-mesenchymaler Transition und der lokalen Invasion von Plattenepithelkarzinomen beschrieben. *FAT1* war daher das vielversprechendste Gen und wir fokussierten unsere Untersuchungen darauf. Auch andere Arbeitsgruppen hatten bereits in humaner Epidermis Mutationen in diesem Gen gefunden (**Martincorena et al., 2015**).

**Tabelle 1: Mutierte Gene in Melanom-assoziierten Keratinozyten, analysiert durch *whole-genome sequencing*.**

Gene	Patient ID	Exon with mutation	Reads IGV	AF (Varvis)
FAT1	LE-11	Exon 13; C-T; splice acceptor variant	119 = C: 112/ T: 6	0.05
	LE-12	Exon 4; T-A; missense variant	297 = T: 229/ A: 18; 319 = T: 282/ A: 35	0.06
	LE-13	Exon 9; G-A; stop gained	211 = G: 185/ A: 24/ T: 2	0.11

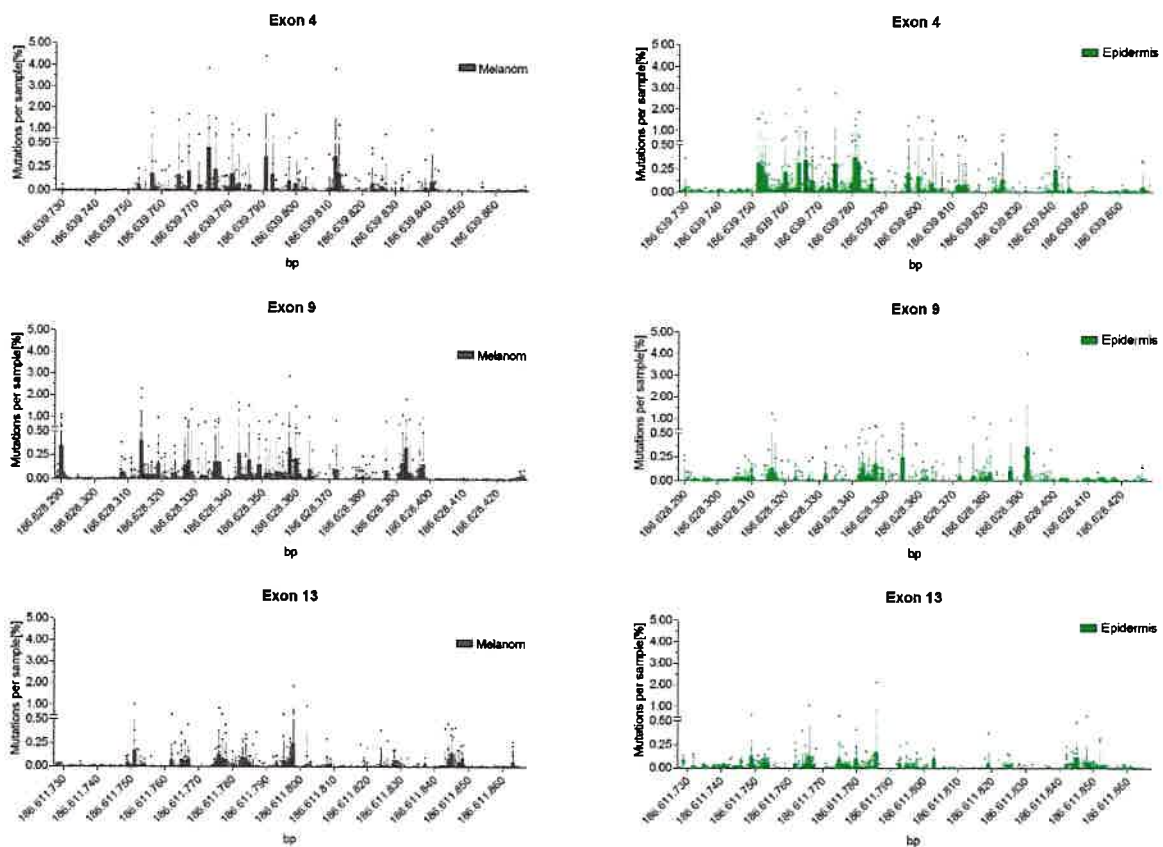
PLXNA4	LE-11	Exon 17; C-T; missense variant	304 = C: 283/ T:21	0.07
	LE-7	Exon 4; GG-AA	237 = G: 225/ A: 12; 235 = G: 223/A: 12	0.05
	LE-1	Exon 12; C-A; missense variant	67 = C: 64/ A: 3	0.06
KIF21B	LE-12	splice region variant; C-T	88 = C: 85/ T: 3; 117 = C: 109/ T: 8	0.07
	LE-6	Exon 34-35; C-T; missense variant	279 = C: 260/ T: 15/ A: 2/ G: 2	0.05
	LE-2	Exon 5; C-T; missense variant	173 = C: 160/ T: 12/ G: 1	0.07
MGAM2	LE-12	Splice region variant; A-G	201 = A: 190/ G: 11; 213 = A: 208/ G: 4/ N: 1	0.05
	LE-2	Exon 10; G-A; missense; C-T; missense variant	169 = G: 156/ A: 13 127 = C: 119/ T: 8	0.08 0.06
	LE-4	C-A; missense variant	125 = C: 113/ A: 12	0.10

Zunächst wurde ein einer umfassenden Untersuchung geprüft, ob sich zuvor identifizierte genetische Varianten in Keratinozyten, die sich in der Nähe von Melanomzellen befinden, in unabhängigen Kohorten bestätigen lassen. Hierzu wurden die Melanompräparate nach Makrodissektion der Epidermis mittels *next-generation sequencing* sequenziert.

In **Abbildung 2** sind die jeweiligen Mutationen, die in den neuen Präparaten identifiziert wurden, mit ihrem Anteil gegenüber dem Wildtyp aufgeführt. Auffällig ist die relativ hohe Mutationsrate in Keratinozyten in Exon 4 und Exon 9 des *FAT1* Genes. Allgemein werden Mutationsraten kleiner als 1% als Hintergrundrauschen betrachtet, sodass lediglich die Mutationen mit über 2 Prozent von Interesse sind. In Exon 4 kam es im Bereich der vorbeschriebenen Mutation zu einer Häufung von Mutationen. Dies legt nahe, dass zumindest Exon 4 häufiger in Keratinozyten mutiert ist, mit entsprechenden funktionellen Konsequenzen.

#### 4.2 Prüfung der Mutationslast von *in vitro* eingesetzten Keratinozyten-Zelllinien durch Exom-Sequenzierung

Um die Auswirkungen der gefundenen somatischen Varianten in Keratinozytengenen weiter zu analysieren, sollten die später bei den *in vitro* Experimenten eingesetzten Keratinozyten auf ihre bereits vorhandene Mutationslast untersucht werden. Bei der Sequenzierung der immortalisierten primären Keratinozytenlinie NHK1 (später auch verwendet in den Transkriptomuntersuchungen) kam es zu keiner auffälligen Häufung von Mutationen in den untersuchten Exons, sodass wir diese Zellen als Wildtyp betrachteten.



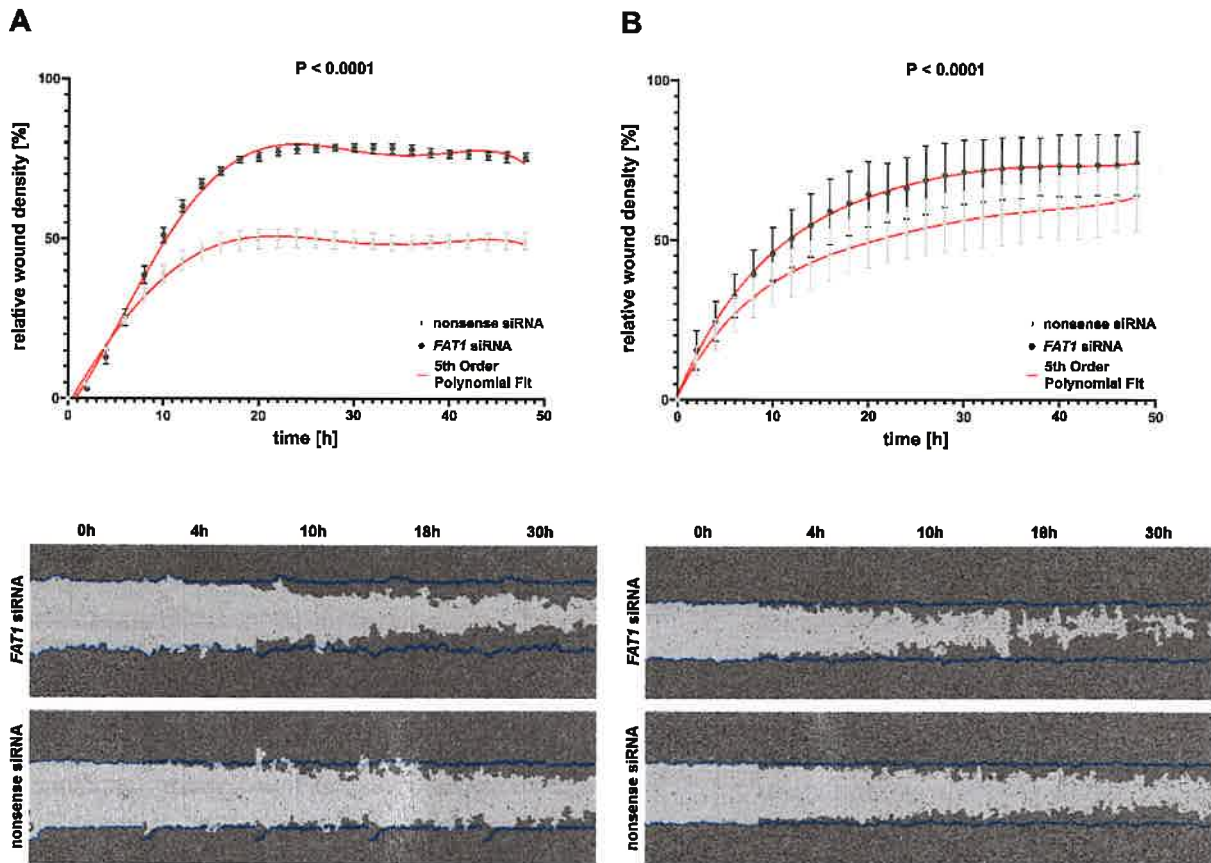
**Abbildung 2: Mutationen in den Exons 4, 9 und 13 in Melanom-assoziierten Keratinozyten einer unabhängigen Kohorte.** Die Analyse erfolgte mittels PCR-basierter Exon-Amplifikation und next-generation sequencing. Angegeben ist der Anteil der mutierten Position im jeweiligen Patienten.

#### 4.3 Gezielte Einführung von genetischen Veränderungen in Keratinozytenkulturen durch CRISPR/Cas Technologie und Untersuchung der funktionellen Konsequenzen

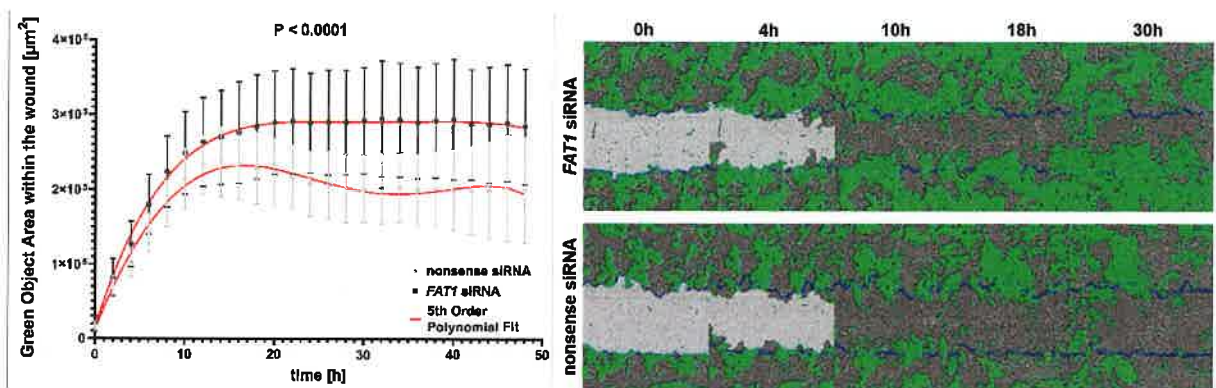
Da es sich bei den gefundenen genetischen Varianten im *FAT1* Gen ausschließlich um inaktivierende Mutationen handelte, haben wir auf eine gezielte Einführung bestimmter genetischer Varianten mittels CRISPR/Cas9 Technologie zunächst verzichtet. Diese Technologie wird später eingesetzt bei den Untersuchungen zum Einfluss einer *FAT1* Inaktivierung auf die Melanom-Transkriptome. Dies geschah in Zusammenarbeit mit der auf diese Technologie spezialisierten Gruppe von Prof. Böttcher am Institut für Molekulare Medizin der Universität Halle (Saale), wie im Antrag beschrieben. Wir haben das *FAT1* Gen zunächst durch einen Knockdown mittels siRNA inaktiviert und die NHK1 Keratinozyten mit diesem Knockdown mit Melanomzellen ko-kultiviert, die mit green fluorescence protein (GFP) stabil transfiziert waren. Anschließend wurde mittels *live-cell imaging* mit dem IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System der Einfluss des Knockdowns auf die Migration (*wound closure assay*) in vitro untersucht. Bei den Melanomzellen handelte es sich um eigene und von anderen Gruppen zur Verfügung gestellten short-term cultures, also Zellen mit sehr niedrigen Passagen.

Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass es durch eine Inaktivierung des *FAT1* Genes in Keratinozyten zu einer verstärkten Migration der jeweiligen Zellen in der Monokultur kam (**Abbildung 2**). Gleiches sahen wir in der Ko-Kultur, wo es durch eine Inaktivierung des *FAT1* Genes in Keratinozyten zu einer verstärkten Migration der Melanomzellen kam (**Abbildung 3**). Dadurch konnten wir die

Bedeutung von *FAT1* für Kontrolle der Migration von Melanomzellen durch Keratinozyten in vitro bestätigen.



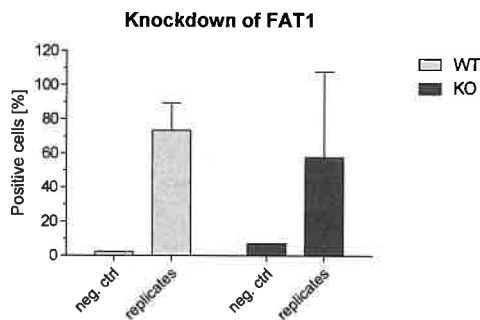
**Abbildung 2: Migrations- (wound closure) Assays von NHK1 (A) und LR0118GFP Melanomzellen (B), jeweils mit *FAT1* Knockdown.** Darunter die live-cell Imaging Bilder. Nach 18 h siRNA Knockdown wurden die Zellen für 24 h kultiviert und in so genannten *wound closure assays* eingesetzt. Um die Proliferation zu inhibieren, wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Mitomycin C für 4 h behandelt. Danach wurde der wound scratch automatisch im System durchgeführt und das Einwandern der Zellen in die Wunde mittels IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System alle 2 h untersucht.



**Abbildung 3: Migrations- (wound closure) Assays von NHK1 Keratinozyten mit und ohne *FAT1* Knockdown in Ko-Kultur mit and LR0118GFP Melanomzellen.** Die Behandlung der Zellen und Analyse erfolgte wie in Abbildung 2. Bilder des *live-cell imaging* rechts.

#### 4.4 Transkriptomsequenzierung von genetisch veränderten Keratinozyten und Melanomzellen/Melanozyten *in vitro* zur Analyse der induzierten transkriptionellen Veränderungen.

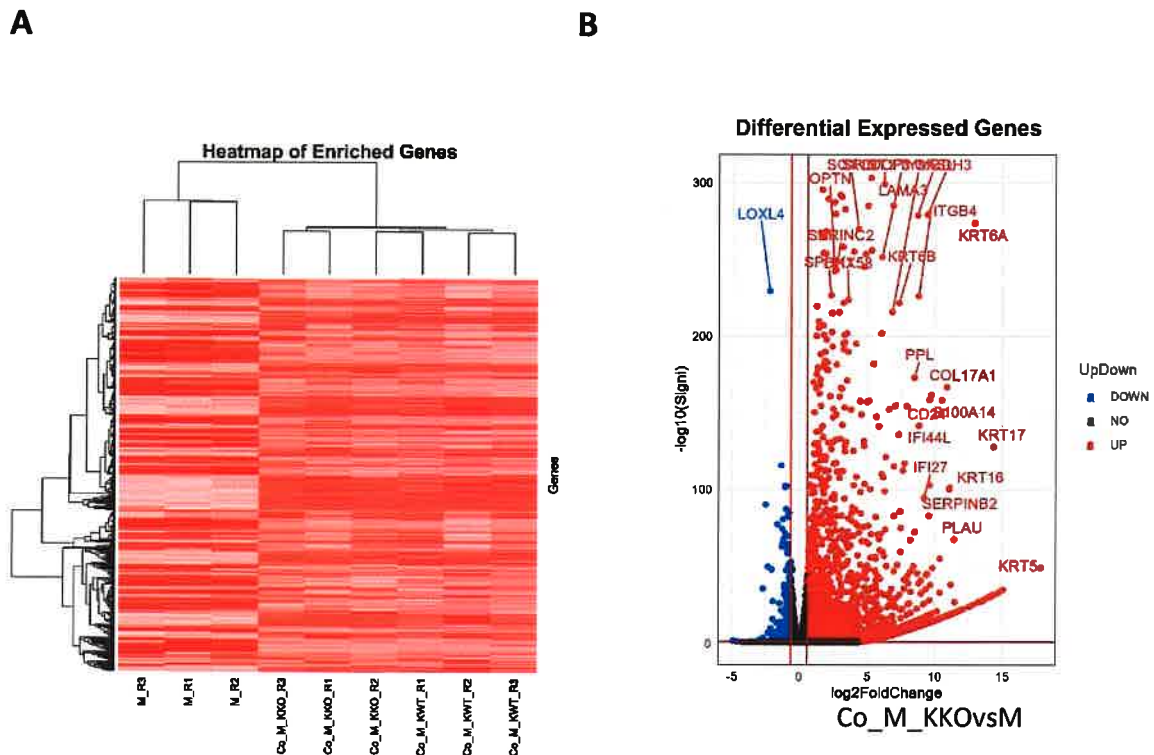
Mittels RNA-Sequenzierung (RNA-seq) sollte dann untersucht werden, welchen Einfluss Keratinozyten grundsätzlich auf das Transkriptom von Melanomzellen haben, und welchen Einfluss ein Gen Knockdown oder Knockout von *FAT1* in Keratinozyten auf das Transkriptom der Melanomzellen in der Ko-Kultur hat. Hier entschlossen wir uns für einen Knockout mittels CRISPR/Cas9 Technologie. Danach wurden die Knockout Keratinozyten mit Melanomzellen ko-kultiviert. Die Melanomzellen wurden von den Keratinozyten getrennt und das Transkriptom separat analysiert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Novogene® Corporation Inc, U.K. (wie im Antrag beschrieben). Der Knockout von *FAT1* in Keratinozyten wurde mittels Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen das *FAT1* Protein nachgewiesen. Insgesamt kam es zu einem vergleichsweise geringen Knockdown (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4: *FAT1* Knockout in NHK1 Keratinozyten.** Der Knockout von *FAT1* in NHK1 Keratinozyten wurde mittels CRISPR/Cas9 Technologie eingeführt. Der Einfluss der Knockout auf die Proteinexpression wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen *FAT1* in der Zellkultur untersucht.

**Abbildung 5** zeigt eine Heatmap und Vulkano Blots der differentiellen Expression von Genen in Melanomzellen in der Ko-Kultur verglichen mit Melanomzellen der Monokultur. Hierbei ergab sich ein eindeutiger Unterschied. Es bildeten sich zwei unterschiedliche Cluster (s. Cluster tree in **Abbildung 5a**). Dies deutete darauf hin, dass Keratinozyten einen erheblichen Einfluss auf das Transkriptom von Melanomzellen haben.

In den Vulkano Blots konnte nachgewiesen werden, dass es zur Hochregulation verschiedener Gene kam, wie z.B. *LOXL4*, *SERP2*, *PLAU*, verschiedenen Keratinen, *ITGB4*, *LAMA3* und *OPTN*. Zumindest für *LOXL4* und *SERP2* ist bekannt, dass es in die Migration von Zellen eingreift. *LOXL4* ist an der Migration von Melanomzellen, *ITGB4* an der Metastasierung beteiligt. Leider waren die Unterschiede der Knockout Zellen zu den Wildtypzellen zu gering, um hier wirklich einen Unterschied auszumachen, sodass diese Daten zunächst nur im Hinblick auf die Interaktion zwischen Keratinozyten und Melanomzellen hin interpretiert werden können. Offenbar ist es aber so, dass Keratinozyten Gene in Melanomzellen beeinflussen, die für die Invasion und Migration von Bedeutung sind. Weitergehende Untersuchungen müssen hier noch folgen.

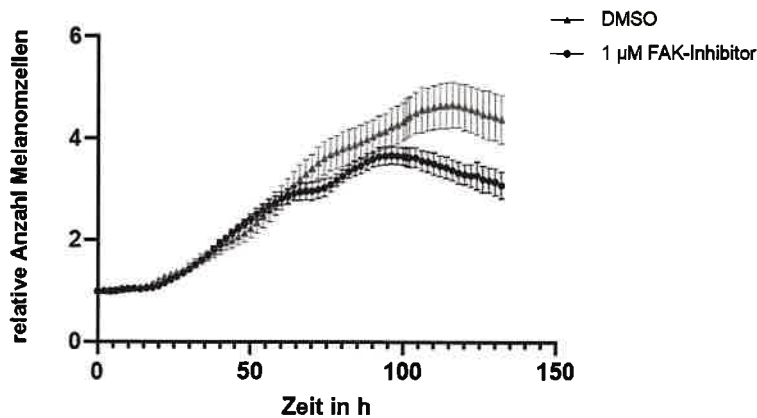


**Abbildung 5: Differentielle Expression von Genen zwischen Melanomzellen in Monokultur und der Ko-Kultur mit Keratinozyten. (A)** Heatmap der differentiellen Gene. **(B)** Volcano Blots der differentiellen Gene. Abkürzungen: M, Melanomzellen, R1-R3, Replikate der Untersuchungen; Co, Ko-Kultur; KKO, Keratinozyten mit Knockdown; KWT, Wildtyp Keratinozyten.

#### 4.5 Identifikation von therapeutischen Substanzen in der Ko-Kultur von Keratinozyten und Melanomzellen/Melanozyten basierend auf den in Melanomzellen/Melanozyten ausgelösten Veränderungen

In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Matrix einen Einfluss auf das Therapieansprechen von Melanomzellen hat und unter anderem die *focal adhesion kinase* (FAK) daran beteiligt ist (Hirata et al., 2015). Wir konnten in unsere Untersuchungen zeigen, dass durch Inhibition der FAK in Keratinozyten die Proliferation von Melanomzellen beeinflusst wird. Dabei wurden NHK1 Zellen isoliert mit dem FAK-Inhibitor PF-562271 behandelt und dann mit Melanomzellen ko-kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der FAK in Keratinozyten zu einer signifikant reduzierten Proliferation der Melanomzellen in der Ko-Kultur führt (Abbildung 6). Dieses Experiment bestätigte, dass unser experimenteller Ansatz grundsätzlich für weitere Untersuchungen geeignet ist. Untersuchungen mit anderen inhibitorischen Substanzen der Zelladhäsion müssen noch folgen.





**Abbildung 6: Proliferation von Melanomzellen in einer Ko-Kultur mit FAK-Inhibitor-behandelten NHK1.** Gezeigt ist die relative Anzahl GFP-positiver Melanomzellen in Ko-Kultur mit FAK-Inhibitor behandelten NHK1 Zellen. Die NHK1 Zellen wurden mit 1 µm PF 562271 (FAK-Inhibitor) für 72 h bei 37°C inhibiert und in Ko-Kultur mit Melanomzellen eingesetzt. Die Proliferation der Melanomzellen (relative Anzahl der Melanomzellen) wurde für 130 h gemessen.

#### 4.6 Untersuchung der prognostischen Bedeutung der identifizierten genetischen Varianten

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der Inaktivierung des *FAT1* Genes durch entsprechende Mutationen ist kürzlich eine umfassende Arbeit erschienen, die zeigen konnte, dass *FAT1* Mutationen mit einem besseren Ansprechen der Patienten mit Melanomen und Lungenkarzinomen unter Immuncheckpointinhibitor-Therapie assoziiert sind (Zang et al., 2022). Insgesamt wurden 631 Melanompatienten und 109 Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patienten mit *FAT1* Mutationen ein deutlich besseres Überleben und ein besseres Ansprechen auf die Immuntherapie zeigten. Diese Ergebnisse wurden auch in einer weiteren, Pan-Cancer-Kohorte bestätigt. Patienten mit *FAT1* Mutationen hatten in den Untersuchungen eine höhere Mutationslast, eine größere Infiltration mit Immunzellen und eine stärkere Interferon Signatur. Somit liegt der Nachweis vor, dass *FAT1* Mutationen beim Melanom und anderen Tumoren von prognostischer Bedeutung sind.

#### 5. Zusammenfassende Bewertung

Insgesamt konnten die gesteckten Ziele in dem Projekt erreicht werden. Wir konnten den Zusammenhang zwischen genetisch veränderten Keratinozyten in Melanomen und ihre Bedeutung für die Melanomentstehung weiter aufklären und hier wichtige neue Erkenntnisse gewinnen. Weitere Untersuchungen sollen basierend auf diesen Ergebnissen folgen.

Leipzig, 06.07.2023

Prof. Dr. med. U.C. Simon  
Direktor der Klinik

Prof. Dr. med. M. Kunz  
Oberarzt

## 6. Literaturverzeichnis

Arnette CR, Roth-Carter QR, Koetsier JL, Broussard JA, Burks HE, Cheng K, Amadi C, Gerami P, Johnson JL, Green KJ. Keratinocyte cadherin desmoglein 1 controls melanocyte behavior through paracrine signaling. *Pigment Cell Melanoma Res* 2020; 33(2):305-317.

Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, Larkin J, Marais R, Sahai E. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin  $\beta 1$ /FAK signaling. *Cancer Cell* 2015; 27(4):574-88

Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, Ellis P, Van Loo P, McLaren S, Wedge DC, Fullam A, Alexandrov LB, Tubio JM, Stebbings L, Menzies A, Widaa S, Stratton MR, Jones PH, Campbell PJ. Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 2015; 348(6237):880-6.

Mescher M, Jeong P, Knapp SK, Rübsam M, Saynisch M, Kranen M, Landsberg J, Schlaak M, Mauch C, Tüting T, Niessen CM, Iden S, The epidermal polarity protein Par3 is a non-cell autonomous suppressor of malignant melanoma. *J Exp Med* 2017; 214(2):339-358.

Zhang W, Tang Y, Guo Y, Kong Y, Shi F, Sheng C, Wang S, Wang Q. Favorable immune checkpoint inhibitor outcome of patients with melanoma and NSCLC harboring FAT1 mutations. *NPJ Precis Oncol*. 2022; 6(1):46.