

Universität Ulm
Institut für Pathologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

Validierung eines Protokolls zur manuellen,
mutationsspezifischen BRAF V600E Immunhistochemie

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Hanns-Christian Dinges

im Jahr:
2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Barth

Tag der Promotion 13.01.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	6
2.1 Studiendesign	6
2.2 Patientenkohorte	6
2.3 Gewebeverarbeitung.....	6
2.4 Immunhistochemie	7
2.4.1 Protokoll.....	7
2.4.2 Epitopdemaskierung	9
2.4.3 Primärantikörper	9
2.4.4 Detektionssysteme	10
2.4.5 Systematische Etablierung des VE1 Antikörpers	11
2.4.6 Nicht weiterverfolgte Färbungsversuche (Sackgassen).....	18
2.4.7 Reagenzien, Verbrauchsmaterialen und Hilfsgeräte	20
2.5 Beiträge anderer Arbeitsgruppen	22
2.5.1 Automatisierte Immunhistochemie (Heidelberg)	22
2.5.2 Western Blot	23
2.5.3 DNA-Extraktion und BRAF V600E Genotypisierung.....	24
2.6 Statistische Analyse	25
2.6.1 Intraklassen-Korrelationskoeffizient	25
2.6.2 Youden Index.....	26
3 Ergebnisse	27
4 Diskussion	33
5 Zusammenfassung.....	40
6 Literaturverzeichnis	42
Anhang	51
Urheberrechtserklärung	58
Danksagung.....	59
Curriculum vitae	61

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Colo 205	humane kaukasische Adenokarzinom-Zelllinie des Colons (<i>BRAF</i> V600E mutiertes Modell)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular-signal regulated kinase, eine mitogen-aktivierte Proteinkinase
FFPE	Formalin fixiert, Paraffin eingebettet
HCLc	klassische Haarzell-Leukämie
HCLv	Haarzell-Leukämie Variante
K1718	Karpas 1718 humane Lymphom-Zelllinie aus Milzgewebe (<i>BRAF</i> Wildtyp Modell)
RAS	G-Protein, die GTP gebundene Form führt zur Aktivierung von RAF
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase (Synonym MAP2K)
VE1	BRAF V600E-spezifischer monoklonaler Maus-Antikörper
wt	Wildtyp
MAP2K	mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase (Synonym MEK)
IHC	Immunhistochemie

PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung, isoton, pH 7,4)
TP	richtig-positiv (true positive)
TN	richtig-negativ (true negative)
FP	falsch-positiv (false positive)
FN	falsch negativ (false negative)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
kDa	Kilodalton (1000 Dalton)
SMZL	Splenisches Marginalzonenlymphom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
AP	Alkalische Phosphatase
BM	Knochenmark
Mut	mutiert
CC1	Zell-Aufbereitungssubstanz 1 (Cell Conditioner 1) der Firma Ventana Medical Systems
MW	Mikrowelle
X'	Zeit (in Minuten)
PC	Pressure Cooker
PX	Peroxidase bzw. manuelle Färbung mit Peroxidase (funktionell identisch mit HRP)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)

RT	Raumtemperatur
ST	Dampfgarer (steamer)
TRS	TRIS Puffer, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
BXT	BenchMark XT automatisiertes Färbesystem der Firma Ventana Medical Systems für Immunhistochemie
CLL	Chronisch-Lymphatische Leukämie (<i>BRAF</i> Wildtyp Kontrolle, die als Knochenmarkstanzbiopsie und somit dekalzifiziert vorliegt)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Immunfluoreszenzmarker für DNA)
HET	heterozygot
N/A	nicht verfügbar (not available) oder nicht getestet
COSMIC	Datenbank somatischer Mutationen aus diversen Arten von Krebs (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer)
ICC	Intraklassen-Korrelationskoeffizient

1 Einleitung

Mutationen des *BRAF* Gens wurden erstmalig 2002 (Davies et al.) beschrieben und können durch fehlerhafte Transkription und Translation zu Fehlfunktionen im daraus resultierenden Protein führen. Über 95% der Mutationen im *BRAF* Gen treffen einen Hotspot auf Codon 600 der Sequenz, wodurch es zu einem Austausch der Aminosäure Glutamat durch Valin im BRAF Protein kommt (=V600E). Die Isoform B der RAF Proteinkinase (BRAF) ist Teil des MAP-Kinase Signalwegs, welcher Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose reguliert. Eine Mitogen-Bindung an einen entsprechenden Rezeptor führt zu einer Aktivierung des G-Proteins RAS, was wiederum zu einer Aktivierung der RAF Proteine und einer Phosphorylierungskaskade über MAP-Kinasen führt. Der oben genannte Basenaustausch ergibt jedoch ein fehlerhaftes BRAF Protein, welches nicht mehr der vorgesehenen übergeordneten Kontrolle durch das RAS Protein unterliegt, sondern dauerhaft aktiv ist und fortwährend zum Ablauf der darunterliegenden Signalkaskade führt (Hoeflich et al., 2009; McCubrey et al., 2006; Wong et al., 2009). Dies macht *BRAF* zu einem potentiellen Onkogen.

Die Häufigkeit von *BRAF* Mutationen in Krebsarten ist in Tabelle 1 dargestellt. Dass man *BRAF* Mutationen in Tumoren nachweisen kann ist zwar schon länger bekannt, jedoch ist die V600E Mutation in den letzten Jahren Ziel intensiver Forschung geworden. Zunächst wurde sie nur als prognostischer Biomarker verstanden, der mit einem kürzeren Überleben betroffener Malignompatienten assoziiert war (Safaee et al., 2012; Teng et al., 2012). Nachdem Arbeitsgruppen wie Tiacci et al. (2011), Loughrey et al. (2007) und Parsons et al. (2012) allerdings gezeigt haben, dass die V600E mit virtuell 100% Prävalenz in Klassischer Haarzellleukämie zu finden ist und dass man sie auch als diagnostisches Kriterium dieser und anderer Krankheiten wie dem Lynch Syndrom einsetzen kann, erkannte man das Potential von BRAF als mögliches Ziel einer individuellen Krebstherapie (engl. targeted therapy).

Tabelle 1. Häufigkeiten von *BRAF* Mutationen in ausgewählten Neoplasien

Neoplasie	Mutiert/Getestet*	Prozent
Hämatopoetisches System		
Haarzell-Leukämie	416/470	88.5
Langerhanszell Histiozytose	45/78	57.7
Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	11/338	3.2
Chronisch lymphatische Leukämie	1/9	11.1
Malignes Melanom	7140/16098	44.4
Schilddrüse		
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	14500/27740	52.3
Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	9/553	1.6
Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	152/613	24.8
ZNS, Astrozytom WHO Grad IV	18/1089	1.7
Lunge		
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	1/160	0.6
Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	37/2616	1.4
Adenokarzinom	172/6459	2.7
Plattenepithelkarzinom	18/1192	1.5
Gastrointestinalum		
Leber, Hepatozelluläres Karzinom	16/357	4.5
Magen, Adenokarzinom	4/800	0.5
Duktales Adenokarzinom des Pankreas	9/469	1.9
Kolon, Adenokarzinom	6542/61613	10.6
Sessiles serratiertes Adenom	435/634	68.6
Gynäkologisch		
Brust, Duktales Adenokarzinom	1/482	0.2
Cervix, Plattenepithelkarzinom	1/216	0.5
Adenokarzinom	5/144	3.5
Uterus, Endometriumkarzinom	37/2161	1.7
Ovar, Seröses Adenokarzinom	19/1539	1.23
Seröser Borderline-Tumor	204/555	36.8
Mikropapilläres seröses Karzinom	17/44	38.6
Niere, Klarzellkarzinom	6/718	0.8
Prostata, Adenokarzinom	22/1142	1.9

*Daten exportiert aus der COSMIC Datenbank (www.cancer.sanger.ac.uk/; Status Januar 2014)

Auch wenn nicht abschließend geklärt ist, ob in *BRAF*-positiven Tumoren diese Mutation allein für die Entstehung von Krebs verantwortlich ist oder überhaupt sein kann, ist *BRAF* zu einem wichtigen diagnostischen, prognostischen und prädiktiven Biomarker aufgestiegen. Bisweilen können durch die *BRAF* Mutationsanalyse Untergruppen von Kolonkarzinomen diagnostiziert werden, einschließlich der genannten Identifikation von Patienten mit Lynch Syndrom (Loughrey et al., 2007; Parsons et al., 2012) und der Klassischen Haarzellleukämie (Tiacci et al., 2011). Es liegt nahe, dass *BRAF* Mutationen ein charakteristisches Merkmal zur Beschreibung und zum Verständnis dieser und anderer Krankheiten sind (Andrulis et al., 2012; Lennerz et al., 2012).

Im Zuge dieser Erkenntnisse wurden mittlerweile zugelassene inhibitorische Antikörper (Vemurafenib und Dabrafenib) gegen das mutierte *BRAF* Protein entwickelt, was die gezielte Krebstherapie bei nachgewiesener Mutation bereits in der klinischen Praxis ermöglicht. So zeigte Chapman et al. (2011) als erste Arbeitsgruppe ein sehr gutes Ansprechen von Patienten mit Malignem Melanom auf die Inhibitoren und mittlerweile sind weitere Studien erschienen, die den Benefit einer solchen Therapie untermauern (Tiacci et al. 2015, Puzanov et al. 2015). Die Identifikation von Patienten, die von einer Behandlung mit diesen Antikörpern profitieren können, ist also von hoher klinischer Relevanz (Chapman et al., 2011; Salama et al., 2013; Sosman et al., 2012; Dienstmann et al., 2011). Daher ist auch die *BRAF* Diagnostik ein fester Bestandteil der klinischen Praxis geworden und es stellt sich die Frage nach dem geeignetsten diagnostischen Verfahren zur sensitiven *BRAF* Detektion (Millington et al., 2013; Salama et al., 2013; Ziai et al., 2012). Grundsätzlich stehen für die *BRAF* Diagnostik alle Formen der Gensequenzierung zur Verfügung und es gibt bereits einen kommerziell erhältlichen *BRAF* V600 Test (cobas® *BRAF* V600 Mutation Test, Fa. Roche), der auf diesem Verfahren beruht. Im Jahr 2011 veröffentlichte die Arbeitsgruppe Capper (et al.) jedoch eine Arbeit zur *BRAF*-V600E spezifi-

schen Immunhistochemie mithilfe eines monoklonalen Mausantikörpers (VE1). Dieser ist mittlerweile ebenfalls kommerziell erhältlich und steht als diagnostische Alternative zur Verfügung. Mehrere Arbeitsgruppen haben daher die Immunhistochemie an die diversen *BRAF* positiven Tumorentitäten angewendet (Bosmuller et al., 2013; Colomba et al., 2013; Curry et al., 2012; Heinzerling et al., 2013; Ihle et al., 2014). In einigen Arbeiten gelang dies mit großem Erfolg, so zum Beispiel in Malignem Melanom (Capper et al., 2011), kolorektalen Karzinomen (Affolter et al., 2013; Sinicrope et al., 2013), serösem Ovarialkarzinom (Bosmuller et al., 2013), Haarzell-Leukämie (Andrulis et al., 2012) und papillärem Schilddrüsenkarzinom (Capper et al., 2011). Auch größere Studien (Day et al. 2015) und eine Metaanalyse zu dem Thema belegen Ergebnisse des VE1 Antikörpers (Pyo et al. 2016). Jedoch wurden auch Studien veröffentlicht, die aufgrund schwacher Testperformance der *BRAF*-spezifischen Immunhistochemie davon abraten, sie als Alternative zur Gensequenzierung einzusetzen (Adackapara et al., 2013; Sperveslage et al., 2013). Ein Erklärungsversuch, warum die Studienergebnisse mit dem VE1 Antikörper so heterogen ausfallen, ist, dass es in der Durchführung der Immunhistochemie an sich sehr viele Variablen gibt, welche alle gravierenden Einfluss auf die Ergebnisqualität und -validität haben können. Hinzu kommt, dass einige Labore mit voll- oder teil-automatisierten Färbesystemen arbeiten und dass die unterschiedlichen Hersteller wiederum verschiedene Reagenzien benutzen. Und so ist es oft ein langwieriger und manchmal erfolgloser Prozess, einen neuen Antikörper mit validen Ergebnissen in die Routinediagnostik zu implementieren, auch wenn andere Labore die bereits erfolgreich durchgeführt haben (und auch veröffentlicht haben). Dies betrifft vor allem größere Institute bei der Anwendung neuer Protokolle. Kleinere Labore dagegen stehen bei auch vor dem Problem, dass sie mitunter nicht über die entsprechenden voll- oder teil-automatisierten Färbesysteme verfügen, was für sie die Implementierung neuer publizierter Protokolle noch erheblicher erschwert.

Vor dem Hintergrund der Vielzahl an immunhistochemischen Nachweismethoden und Protokollen ist die klinische Implementierung des mittlerweile erhältlichen *BRAF*-mutationsspezifischen Antikörpers schwierig. Unter Berücksichtigung der kli-

nischen Relevanz des Nachweises der BRAF V600E Mutation bearbeitete ich folgende Fragestellung: Welches immunhistochemische Verfahren zeigt die besten testanalytischen Kennwerte im Vergleich zur DNA-basierten Genotypisierung?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Diese Studie ist eine Machbarkeits- und Validierungsstudie und wurde als retrospektive Kohortenstudie designt. Im ersten Schritt wurde die grundsätzliche Machbarkeit einer manuellen Immunhistochemie mit dem BRAF-Antikörper sowohl in Routinebiopsien, als auch in dekalzifizierten Knochenmarkbiopsien untersucht. Danach wurde eine Kohorte von 33 Fällen generiert, für die Pyrosequenzierungsergebnisse bereits vorlagen. Anschließend wurden die Fälle der Kohorte je einmal manuell und automatisiert immunhistochemisch gefärbt. Untersucht wurden die absolute Testperformance und die Ergebniskorrelation. Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte verblindet für den sequenzanalytisch bestimmten *BRAF* Mutationsstatus.

2.2 Patientenkohorte

Die Fälle wurden mittels ICD-O Kodierung und anonymisierter Suche in der Datenbank und den Archiven des Instituts für Pathologie der Universität Ulm zusammengestellt. Es handelte sich um Biopsien aus der diagnostischen Klinikroutine. Alle Diagnosen, die zu den jeweiligen Präparaten gestellt und hinterlegt waren, sind von Fachärzten für Pathologie nach WHO Kriterien gestellt worden. Für die Kohorte kamen nur Proben in Frage, für die der *BRAF* Mutationsstatus bereits durch Pyrosequenzierung festgestellt und hinterlegt worden war. Es wurden dafür 19 klassische Haarzellleukämien, 2 variante Haarzellleukämien, 6 Splenische Marginalzonenlymphome, sowie 6 Maligne Lymphome identifiziert auf die die genannten Kriterien zutrafen. Aus ihnen wurde die Testkohorte von 33 Fällen generiert.

2.3 Gewebeverarbeitung

Es wurden Routinebiopsien verwendet, welche in Formaldehydlösung fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet vorlagen. Im Falle von Knochenmarkstanzen wurden sie außerdem dekalzifiziert, um die gewünschte Haltbarkeit zu erreichen. Sie wurden zur weiteren Verarbeitung in 2-5 µm dicke Schichten geschnitten, auf Objektträger

gebracht und über Nacht bei 37° Celsius im Wärmeschrank getrocknet. Die Färbung erfolgte meistens am folgenden Vormittag, in Einzelfällen jedoch auch erst wenige Tage später.

2.4 Manuelle Immunhistochemie

Die manuelle Immunhistochemie ist der zentrale Bestandteil an neuer wissenschaftlicher Arbeit in der vorliegenden Dissertation. Sämtliche hier dargestellten Versuche wurden vom Autoren selbstständig durchgeführt.

2.4.1 *Protokoll*

1. Entparaffinierung

- 3x Xylolbad, je 5 Minuten
- Abtropfen, 1x spülen in Alkohol (absolut)
- 1x Alkoholbad (absolut), 5 Minuten
- 1x Alkoholbad (90%), 5 Minuten
- 1x Alkoholbad (70%), 5 Minuten
- Spülen in Aqua destillata

2. Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (eine der folgenden)

- Steamer (Dampfgarer)
 - i. Pufferlösung wählen (ETDA pH 8,0/TRS pH 6,1)
 - ii. Schnitte in vorgeheiztem Puffer und Steamer inkubieren (20/30/60 Minuten)
 - iii. Abkühlen der Küvetten in Eiswasser, 10 Minuten
 - iv. Spülen in Aqua destillata
- Mikrowelle
 - i. Schnitte in Citrat Puffer pH 6,0 stellen
 - ii. Wasserschale in der Mikrowelle füllen
 - iii. Kochen für 20 Minuten, zwischendurch Wasserschale auffüllen (darf nicht leer werden)

- iv. Unter Leitungswasser abkühlen
- Schnellkochtopf (SKT)
 - i. Schnitte in bereits kochenden Citrat Puffer pH 6,0 stellen
 - ii. Schließen, Druckstufe 2 wählen, erhitzen mit maximaler Leistung, wenn der Druck erreicht ist auf 150°C und ab dann 20 Minuten inkubieren
 - iii. Topf mit kaltem Wasser von außen kühlen, nach Abbau des Drucks öffnen und 20 Minuten abkühlen lassen
 - iv. Spülen in Aqua destillata

3. Primärantikörper

- Schnitte in PBS Puffer stellen
- „kringeln“ mit Liquid Blocker Pen (=mit einem wasserabweisenden Stift einen kleinen, geschlossenen Kreis um das Präparat auf dem Objektträger zeichnen)
- (nur bei Peroxidase-Detektionssystem: Substratpufferlösung 7 Minuten inkubieren, dann spülen mit PBS, andernfalls diesen Schritt überspringen)
- Primärantikörper in gewünschter Verdünnung auftragen und bei gewünschter Temperatur (RT/37°C) 30 Minuten inkubieren
- Spülen mit PBS

4. Sichtbarmachung (mit einem der folgenden Detektionssysteme)

- Alkalische Phosphatase
 - i. Biotinylierten Sekundärantikörper 30 Minuten inkubieren
 - ii. Spülen mit PBS
 - iii. Streptavidinkonjugierte Alkalische Phosphatase 30 Minuten inkubieren
 - iv. Spülen mit PBS
 - v. Substrat-Arbeitslösung (Chromogen) 16 Minuten inkubieren
 - vi. Spülen in Leitungswasser um die Reaktion zu stoppen
- Peroxidase

- i. Sekundärantikörper 30 Minuten inkubieren
- ii. Spülen mit PBS
- iii. DAB (3,3'-Diaminobenzidin) 10 Minuten inkubieren
- iv. Spülen in Leitungswasser um die Reaktion zu stoppen

5. Kerngegenfärbung

- Bläuen mit Hämalaun für 5 Minuten
- Spülen mit Aqua destillata

6. Eindecken

2.4.2 *Epitopdemaskierung*

Die Epitopdemaskierung (=Antigen retrieval) soll die Bindungsstellen für den Primärantikörper möglichst freilegen. Meist wird ein thermisches Verfahren, wie in dieser Arbeit mit den handelsüblichen Küchengeräten Schnellkochtopf, Dampfgarer (Steamer) und Mikrowelle gewählt. Der Erfolg der Antigenfreilegung hängt allerdings nicht nur von der Erhitzungsmodalität ab, auch die Dauer der Erhitzung kann sich stark auf den Erfolg der Färbung auswirken. Außerdem spielt die Auswahl der Pufferlösung und ihr pH-Wert beim Erhitzen eine Rolle, für diese Studie kamen Citrat Puffer pH 6,0, EDTA Puffer pH 8,0 und TRS/TRIS Puffer pH 6,1 zum Einsatz.

2.4.3 *Primärantikörper*

Die immunhistochemische Färbung des BRAF-V600E Proteins wurde mit dem monoklonalen, murinen Antikörperklon VE1, entwickelt von Capper et al. (2011), durchgeführt. Zum Teil wurde Zellüberstand der Hybridomzelllinie aus der Originalarbeit von Capper et al. (2011) verwendet, jedoch auch der mittlerweile kommerziell erhältlichen VE1-Klon (Mouse- IgG2a; E19204; DCS Innovative Diagnostics Systems, Hamburg, Germany).

2.4.4 Detektionssysteme

Alkalische Phosphatase: Es wurde mit dem Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (Code K5005, Herstellerangaben) gearbeitet. Die Funktionsweise des Systems sei hier kurz erläutert. Es handelt sich um eine indirekte Immunmarkierung. Das erste Reagenz des Systems ist der Sekundärantikörper. Er stammt aus der Ziege. Im verwendeten Kit liegt eine Mischung aus biotinylierten Anti-Kaninchen und Anti-Maus Immunglobulinen vor (so können mit demselben Kit Kaninchen und Maus Antikörper detektiert werden). Das Reagenz kommt zum Einsatz, wenn der Primärantikörper bereits in der Probe gebunden hat und bindet dann an dessen Fc-Teil. Das zweite Reagenz ist streptavidinkonjugierte alkalische Phosphatase. Streptavidin hat eine hohe Affinität zu Biotin und so wird die Alkalische Phosphatase fest an das Immunkonjugat gebunden. Zuletzt wird die Substrat-Arbeitslösung hinzugegeben. Sie enthält das Chromogen, ein Substrat in diesem Fall für die Alkalische Phosphatase, welches durch die enzymatische Umsetzung eine fixierte rote Färbung an den Stellen hinterlässt, wo der Primärantikörper gebunden hat, wohingegen sie im restlichen Gewebe ausgewaschen wird.

Störfaktor bei dieser Detektion kann die endogene Alkalische Phosphatase sein, die das Chromogen auch an Stellen, an denen es keine Primärantikörper-epitope gibt, umsetzt und zu unspezifischer (Über-)färbung führt. Durch Hinzugeben von Levamisol zum Chromogen kann dieser Effekt gedämpft werden, da Levamisol die endogene Alkalische Phosphatase blockiert.

Peroxidase: Es wurde mit dem Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Code K5007, Herstellerangaben) gearbeitet. Bei dieser Färbung wird nach der Vorbehandlung, jedoch vor Auftragen des Primärantikörpers, ein Peroxidase Substrat Puffer mit neutralem pH für 7 Minuten inkubiert, danach wird der Primärantikörper inkubiert. Die Sichtbarmachung erfolgt dann in 2 Schritten. Zunächst wird der Sekundärantikörper inkubiert. Es handelt sich dabei um ein Gemisch aus Ziegenantikörpern, die entweder gegen den Fc Teil von Maus- oder Kaninchenantikörpern gerichtet sind. So können auch mit diesem Kit beide

Arten von Primärantikörpern detektiert werden. An den Sekundärantikörper ist Meerrettichperoxidase gekoppelt. Ihr wird im nächsten Schritt 3,3'-Diaminobenzidin als Substrat angeboten, welches zu einem braunen Farbstoff umgesetzt wird, der im Gewebe an den Stellen verbleibt, wo der Primärantikörper gebunden hat.

Da die Umsetzung von DAB durch die Peroxidase in einer Braunfärbung resultiert, ist ein Störfaktor dieses Detektionssystems das Melanin Maligner Melanome. Daraus ergab sich für die Etablierung des Antikörpers jedoch ein Problem. Zu den klinisch häufigsten Tumoren, die potentiell *BRAF* mutiert sind, zählen Maligne Melanome. Dementsprechend werden auch Maligne Melanome in der klinischen Routinediagnostik am häufigsten auf *BRAF* Mutationen hin pyrosequenziert und lag für diese Studie in ausreichender Stückzahl vor um einen Antikörper an ihnen zu etablieren. Zudem sind die Proben meist viel größer und ergeben viel mehr Schnitte derselben Probe als Knochenmarkstanzbiopsien, was für den Prozess auch sehr von Vorteil ist. Und natürlich müssen sie nicht dekalzifiziert werden, ein Prozess, der ebenfalls eine immunhistochemische Färbung erschweren kann, besonders im Rahmen der störanfälligen Antikörperetablierung.

2.4.5 Systematische Etablierung des VE1 Antikörpers

Der Erfolg einer Immunhistochemischen Färbung ist von vielen Faktoren während der Durchführung abhängig und das Etablieren eines neuen Antikörpers ist selbst in einem Labor, welches viel Erfahrung mit der Technik hat und Immunhistochemie in der klinischen Routine einsetzt, nicht immer einfach. Da zu dieser Studie erstens nicht unbegrenzt Antikörper zur Verfügung stand, welcher initial noch nicht kommerziell erhältlich war, sondern freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Capper et al. (2011) zur Verfügung gestellt worden war und sich zweitens aus Paraffinblöcken von Knochenmarkbiopsien nur begrenzt histologische Schnitte gewinnen lassen, wurde, abgesehen von diesen absoluten Limitationen, drittens versucht auch beim restlichen Materialverbrauch die Ressourcen des Instituts zu schonen. So erfolgte die Entwicklung eines korrekt klassifizierenden Protokolls schrittweise und immer

auf den vorherigen Färbungsergebnissen aufbauend, anstatt alle möglichen Kombinationen auf einmal zu testen. Dieser Ablauf ist in Abbildung 1 dargestellt. Das Protokoll wurde nach jeder neuen Variation evaluiert, die Ansätze dann an Negativkontrollen überprüft oder auch (bei schwächer werdenden Färbungen im Vergleich zu den vorherigen) verworfen. Die Durchführung der fortlaufenden Suche neuer, geeigneter Fälle aus der Datenbank, respektive dem Archiv des Instituts, die anschließende immunhistochemische Färbung, die Auswertung der Färbung und die Planung des jeweils weiteren Vorgehens wurden vom Autoren dieser Arbeit selbstständig, jedoch unter der wissenschaftlichen Betreuung und Kontrolle von Dr. Jochen Lennerz und Prof. Dr. Peter Möller durchgeführt. In dieser Phase der Protokollentwicklung wurden Proben, deren Genotyp mittels Pyrosequenzierung bestimmt worden und daher bekannt war, verwendet. Nur so konnte die Auswertung der Färbungen nach der Ergebnisklassifikation: richtig positiv (TP = true positive), richtig negativ (TN = true negative), falsch positiv (FP = false positive) und falsch negativ (FN = false negative) erfolgen. Grundlage dieser Klassifikation ist, dass *BRAF* V600E mutierte Proben zu einer Färbung mittels Antikörperbindung führen (positiv), und dass aus Proben des *BRAF* Wildtyps der Antikörper wieder ausgewaschen wird und somit nicht färbt (negativ). Die Färbungsergebnisse der getesteten Protokolle wurden anhand dieser Ergebnismatrix mit denen der Sequenzanalyse verglichen und funktionierende Protokolle wurden jeweils an einer zweiten mutierten und einer zweiten Wildtyp-Gewebeprobe überprüft.

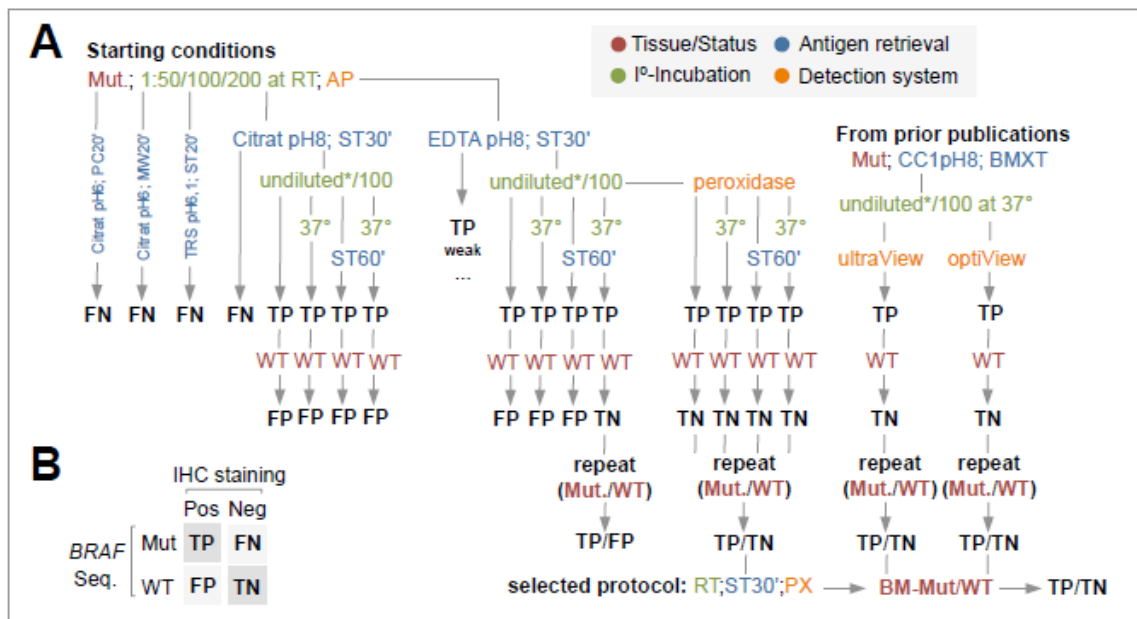


Abbildung 1. Empirische Optimierungsstrategie des IHC Protokolls (auch erschienen in Dinges et al. 2015)

A, Flussdiagramm zur Darstellung der einzelnen Protokolle (Linien) sortiert nach methodischen Variablen (Farbkodierung). Die Ergebnisse (Pfeile) entsprechend der in **B**. dargestellten Ergebnisklassifikation. Jeder Pfeil stellt eine oder mehrere Färbungen mit den im Linienvorlauf aufgelisteten Variablen dar. Mehrere farblich gleich codierte Variablen innerhalb eines Linienvorlaufs entsprechen jedes Mal einem komplett neuen Protokollversuch. **B**, Ergebnisklassifikation durch Vergleich der Färbungsergebnisse mit dem Mutationsstatus welcher durch Pyrosequenzierung für die Probe festgelegt wurde. Legende: AP=Alkalische Phosphatase; BM=Probenmaterial aus Knochenmark; CC1=Cell Conditioner 1 (EDTA basierte Pufferlösung von Ventana); FN=false (falsch) negativ; FP=false (falsch) positiv; Mut.=*BRAF* mutierte Probe aus Malignem Melanom; MW20'=Mikrowelle für 20 Minuten; PC20'=Pressure Cooker (Schnellkochtopf) für 20 Minuten; PX=Peroxidase; RT=Raumtemperatur; ST20/30/60'=Dampfger für 20/30/60 Minuten; TN=true (richtig) negativ; TP=true (richtig) positiv; TRS=Tris-Puffer; WT=*BRAF* Wildtyp Probe aus Malignem Melanom; *=Inkubation mit unverdünntem Antikörper.

Begonnen wurde mit einer kleinen Serie an Färbungen um einen Eindruck zu bekommen, mit welcher der 5 getesteten Formen der Epitopdemaskierung der Antikörper am besten funktioniert und in welcher Verdünnung er sich noch mit gutem Ergebnis verwenden lässt, um von Beginn an möglichst wenig Antikörper zu verbrauchen. Die vorausgehende Entparaffinierung blieb immer gleich. In der Abbildung oben links beginnend wurden zuerst folgende Färbungen durchgeführt:

1. Durch Pyrosequenzierung sicher als *BRAF* mutiert identifiziertes Malignes Melanom (Gewebevariable), Erhitzen im Schnellkochtopf für 20 Minuten in Citrat Puffer pH 6,0 (Epitopdemaskierungsvariable), Inkubation des Pri-

märantikörpers bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:200 (Inkubationstemperatur und -verdünnungsvariable), Detektion mit Alkalischer Phosphatase (Detektionssystemvariable)

2. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, Erhitzen in der Mikrowelle für 20 Minuten in Citrat Puffer pH 6,0, Inkubation des Primärantikörpers bei Raumtemperatur, Verdünnung 1:200, Alkalische Phosphatase
 3. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, Erhitzen im Dampfgarer (Steamer) für 20 Minuten in TRS Puffer pH 6,1, Inkubation des Primärantikörpers bei Raumtemperatur, Verdünnung 1:200, Alkalische Phosphatase
 4. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, Erhitzen im Dampfgarer (Steamer) für 30 Minuten in Citrat Puffer pH 8,0, Inkubation des Primärantikörpers bei Raumtemperatur, Verdünnung 1:200, Alkalische Phosphatase
 5. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, Erhitzen im Dampfgarer (Steamer) für 30 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Inkubation des Primärantikörpers bei Raumtemperatur, Verdünnung 1:200, Alkalische Phosphatase
- 6.-15. Wie 1.-5. In den Verdünnungen (Primärantikörper) 1:100 und 1:50

Die ersten 5 Färbungen waren alle falsch negativ (siehe Abb. 1A, sowie Ergebnis-klassifikation Abb. 1B, sowie exemplarisch Anhang Abb. 4), sodass sie in den Antikörperverdünnungen 1:100 und 1:50 wiederholt wurden. Verdünnungen von bis zu 1:200 sind nicht ungewöhnlich sparsam, sondern funktionieren bei der Mehrzahl von Antikörpern einwandfrei, da die indirekten Detektionssysteme zu einer Signalamplifikation führen, sofern der Primärantikörper ein Epitop gefunden hat. Ab einer Verdünnung des Primärantikörpers von >1:100 fanden sich in den Versuchen mit Dampfgarer und Citrat Puffer pH 8,0 sowie EDTA Puffer pH 8,0 die ersten

schwach positiven Ergebnisse (siehe exemplarisch Anhang Abb. 5). Die Protokollansätze im Citrat Puffer pH 6,0 und TRS Puffer pH 6,0 und hitzeinduzierter Epitopdemaskierung in Mikrowelle und Schnellkochtopf blieben weiterhin erfolglos, sodass sie nicht weiterverfolgt wurden.

Nach den ersten positiven Farbreaktionen folgte nacheinander eine Reihe von Protokollansätzen mit dem Ziel das Farbsignal zu verstärken. Dies erfolgte wie in der Abbildung dargestellt erstens durch den Einsatz von unverdünntem Primärantikörper (grün), zweitens längere Inkubationszeit des Primärantikörpers (grün) und drittens längere Erhitzung im Dampfgarer zur besseren Epitopfreilegung (blau).

16. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei Raumtemperatur unkubiert, Dampfgarer für 30 Minuten in Citrat Puffer pH 8,0, Alkalische Phosphatase

17. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert, Dampfgarer für 60 Minuten in Citrat Puffer pH 8,0, Alkalische Phosphatase

18. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei 37°C inkubiert, Dampfgarer für 30 Minuten in Citrat Puffer pH 8,0, Alkalische Phosphatase

19. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei 37°C inkubiert, Dampfgarer für 60 Minuten in Citrat Puffer pH 8,0, Alkalische Phosphatase

20.-23. Negativkontrollen (*BRAF* Wildtyp Malignes Melanom) der Versuche 16.-19.

Diese Versuche verbesserten das Farbsignal zwar immer weiter (siehe exemplarisch Anhang Abb. 6A, 6B, 7A und 7B), als dann jedoch die Negativkontrollen (20.-23.) ebenfalls positiv (falsch positiv) waren, mussten die Protokollansätze verworfen werden (siehe exemplarisch Anhang Abb. 8A bis 8D). Es wurde somit weiter an den Ansätzen in EDTA Puffer pH 8,0, welche initial auch schon schwach positiv gewesen waren, gearbeitet und das Vorgehen aus 16.-19. mit EDTA Puffer pH 8,0 im Dampfgerar wiederholt.

24. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei Raumtemperatur, Dampfgerar für 30 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Alkalische Phosphatase

25. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert, Dampfgerar für 60 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Alkalische Phosphatase

26. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei 37°C inkubiert, Dampfgerar für 30 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Alkalische Phosphatase

27. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei 37°C inkubiert, Dampfgerar für 60 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Alkalische Phosphatase

28.-31. Negativkontrollen (*BRAF* Wildtyp Malignes Melanom) der Versuche 24.-27.

In diesen Versuchen konnte das Signal im Vergleich zu 16.-19. zwar noch weiter verbessert werden, jedoch blieben bei 24. bis 27. die Negativkontrollen weiterhin (falsch) positiv. Lediglich das im Vergleich aufwendigste Protokoll 27. lieferte auch ein (richtig) negatives Ergebnis an *BRAF* Wildtyp Malignem Melanom. Allerdings

ließ sich dieses zunächst korrekt klassifizierende Protokoll an anderen Malignen Melanom nicht mehr wiederholen, auch hier ergab sich wieder eine falsch positive Färbung in der Negativkontrolle, sodass es ebenfalls verworfen werden musste.

Als nächstes wurde das Detektionssystem als Variable verändert und statt mit Alkalischer Phosphatase, wurde im Folgenden mit Peroxidase gearbeitet. Wegen der daraus resultierenden Braunfärbung, die eine Identifikation mutierter Zellen in Gegenwart von Melanin erschwert, wurde dieses Detektionssystem vorher als zu problematisch angesehen.

32. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei Raumtemperatur, Dampfgerar für 30 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Peroxidase

33. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert, Dampfgerar für 60 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Peroxidase

34. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei 37°C inkubiert, Dampfgerar für 30 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Peroxidase

35. *BRAF* mutiertes Malignes Melanom, unverdünnter Primärantikörper bei 37°C inkubiert, Dampfgerar für 60 Minuten in EDTA Puffer pH 8,0, Peroxidase

36.-39. Negativkontrollen (*BRAF* Wildtyp Malignes Melanom) der Versuche 32.-35.

In diesen Versuchen waren die Negativkontrollen jedes Mal (richtig) negativ. Auch die Wiederholung an einem neuen Set *BRAF* mutierter und Wildtyp Proben Maligner

Melanome blieb korrekt klassifizierend. Da sich in der Qualität der Färbung keine Vorteile durch eine längere Antigenfreilegung im Dampfgerar und der Primärantikörperinkubation bei 37°C ergaben, wurde für weitere Arbeit das am wenigsten aufwendige Protokoll ausgewählt. Um die Validierungsstudie nicht mit unverdünntem Antikörper durchführen zu müssen, erfolgte schließlich noch eine Versuchsreihe mit absteigenden Antikörperverdünnungen mit dem Ergebnis, dass eine Primärantikörperverdünnung von 1:100 für eine manuelle immunhistochemische Färbung ausreichend ist. Das für die anschließende methodische Validierungsstudie ausgewählte Protokoll für die manuelle Färbung mit dem VE1 Antikörper bestand somit aus:

- Epitopdemaskierung in EDTA Puffer pH 8,0 im Dampfgerar für 30 Minuten erhitzt
- Inkubation des Primärantikörpers verdünnt 1:100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Detektion mittels Peroxidase

2.4.6 *Nicht weiterverfolgte Färbungsversuche (Sackgassen)*

Immuncytochemie: Auf dem Weg zum korrekt klassifizierenden immunhistochemischen Protokoll für eine manuelle Färbung mit dem VE1 Antikörper wurde außerdem mit FFPE Schnitten aus den Zellkulturen Colo 205 (*BRAF* V600E mutiertes Zellmodell) und K1718 (*BRAF* Wildtyp Zellmodell) gearbeitet. Die Paraffinblöcke mit den entsprechenden Zellkulturen wurden von Dr. Silke Bruderlein freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hintergrund dieser Versuche (die keine verwertbaren Ergebnisse hervorbrachten) war, dass Störfaktoren aus Bindegewebe und interzellulärer Matrix ausgeblendet werden sollten, um dem VE1 Antikörper eine spezifischere Bindung (richtig positiv und richtig negativ) zu ermöglichen. In diesen Versuchen wurde mit Alkalischer Phosphatase als Detektionssystem benutzt, die letztlich nur in einem einzigen Fall mit dem VE1 Antikörper funktioniert hatte und auch im Zellmodell

neigte der Antikörper zum überfärben. Die übrigen verwendeten Protokollvariablen waren Steamer mit EDTA pH 8,0 für 30 Minuten, Antikörperinkubation bei Raumtemperatur und unverdünnt.

Immunfluoreszenz: Des Weiteren wurden Versuche mit Immunfluoreszenzdetektionssystemen gegen den monoklonalen Mausantikörper VE1 durchgeführt. Es wurde mit folgendem Protokoll gearbeitet:

1. Entparaffinierung

- Vorgehen wie in 2.4.1

2. Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung

- Vorgehen wie in 2.4.1, gewählt:
Steamer EDTA Puffer pH 8,0 für 60 Minuten

3. Primärantikörper

- Vorgehen wie in 2.4.1, gewählt:
Inkubation bei 37°C für 30 Minuten mit VE1 Antikörper (Maus)

4. Sekundärantikörper

- Biotinylierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper für 30 Minuten inkubieren
- Spülen in PBS

5. Fluoreszenzantikörper

- Spätestens an diesem Punkt Wechsel in abgedunkelten Raum
- Streptavidinkonjugierten Fluoreszenzantikörper 30 Minuten inkubieren
- Spülen in PBS

6. Kerngegenfärbung (DNA-Färbung)

- Schnitte für 20 Sekunden in DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) stellen
- Spülen in Aqua destillata

7. Eindecken

Die Schritte bis zum Sekundärantikörper entsprechen im Wesentlichen denen dem in 2.4.1 beschriebenen Protokoll. Gewebe war in dieser Versuchsreihe *BRAF* V600E mutiertes Knochenmark eines Haarzelleukämiepatienten und als Negativkontrolle Knochenmark eines CLL-Patienten (Chronisch-Lymphatische Leukämie). Da wieder die Streptavidin-Biotin-Methode für die indirekte Detektion des Primärantikörpers verwendet wurde, war der Sekundärantikörper ein biotinylierte Kaninchen-anti-Maus Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/Biotinylated Code-Nr. E 0354, Dako Denmark A/S). Dieser wurde in separaten Versuchen mit streptavidinkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffen der Wellenlängen 488 nm (grün) und 546 nm (rot) sichtbar gemacht. Die verwendeten Farbstoffe waren „streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate“ (Produktnummer S11223) und „streptavidin, Alexa Fluor® 546 conjugate“ (Produktnummer S11225) beide von der Firma Life Technologies Limited (SCOTLAND). Die Ergebnisse waren beim Farbstoff der Wellenlänge 488 zwar besser (weniger unspezifische Hintergrundfärbung) als bei 546, eine spezifische Unterscheidung zwischen *BRAF* V600E mutierter Probe (Haarzelleukämie) und Wildtyp Probe (CLL) war jedoch nicht möglich und es erfolgten keine weiteren Versuche in dieser Richtung.

2.4.7 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Hilfsgeräte

Tabelle 2. Materialien für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Hersteller
Alkaline Phosphatase/RED	Dako
Anti-mouse-AB (biotinyliert)	Dako
Brutschrank für Paraffinschnitte	Heraeus Instruments
Citrat Puffer	Selbsterstellung pH 6,0/8,0
Dapi	Sigma-Aldrich
Deckgläser	VWR International
Digitale Fotokamera KY-F75U	JVC

EDTA-Puffer	Zytomed Systems
Ethanol	Merck
Glasobjektträger	Thermo Scientific
Hämatoxylin	Dako
Handschuhe Latex	Sarstedt
Handschuhe Nitril	Sarstedt
Heizplatte	W. Pfennig El. med. Apparatebau
Kühlschrank	Liebherr
Microwelle	Macrom Professionals
Mikropipetten (10µl, 50µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf
Mikroskop Axiolab	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axiphot	Zeiss
Mikroskop Fluoreszenz	Zeiss Oberkochen
Mini Pap Pen	Zytomed Systems
PBS Puffer	Lonza
Peroxidase/DAB	Dako
Pipettenspitzen Biosphere (10ml; 100ml)	Eppendorf
Schnellkochtopf Sicomatic-L	Silit
Standardreaktionsgefäß (1,5ml)	Eppendorf
Steamer Multi Gourmet	Braun
Streptavidin Alexa Fluor 488/546 conjugate	Life Technologies Limited
TRS (target retrieval solution) 10x Konzentrat	Dako
Xylol	Merck

2.5 Beiträge anderer Arbeitsgruppen

2.5.1 *Automatisierte Immunhistochemie (Heidelberg)*

Um die Ergebnisse der manuellen Immunhistochemie mit denen der automatisierten Immunhistochemie (für die bereits Studien mit etablierten Protokollen veröffentlicht wurden) vergleichen zu können, musste die Studienkohorte auch mit einem automatisierten Färbesystem getestet werden. Und da in fast allen bisher veröffentlichten Studien zur BRAF IHC das Ventana Benchmark XT System verwendet wurde, die Universität Ulm jedoch nicht über ein solches Gerät verfügt, wurde eine Serie Objektträger mit Schnitten der Studienkohorte nach Heidelberg geschickt. Die dortige Arbeitsgruppe von David Capper und Andreas von Deimling (Erstbeschreiber des VE1 Antikörpers) hatte sich freundlicherweise bereiterklärt, die Kohorte mit ihrem Autostainer entsprechend dem Protokoll aus den in 2011 und 2013 veröffentlichten Arbeiten zu färben und für die Auswertung, welche wiederum durch den Autor dieser Arbeit erfolgte, nach Ulm zurückzuschicken.

Verwendetes Protokoll:

- Färbesystem: Ventana BenchMark XT, (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona)
- Epitopdemaskierung mit Cell Conditioner 1 für 64 Minuten
- Inkubation des Primärantikörpers für 32 Minuten bei 37°C in einer Verdünnung von 1:5
- Inkubation mit OptiView HQ Universal Linker (Sekundärantikörper) für 12 Minuten
- Inkubation OptiView HRP Multimer (Peroxidasekonjugierter Tertiärantikörper) 12 Minuten
- Signalamplifikation mit OptiView Amplification Multimer für 8 Minuten
- Kernfärbung mit Hämatoxylin

Herstellerangaben zu den einzelnen Reagenzien zur besseren Vergleichbarkeit der manuellen und automatisierten Färbung:

Cell Conditioner 1: TRS basierte Pufferlösung mit einem pH von 8,5

OptiView HQ Universal Linker: Ziege-Anti-Maus (IgG und IgM, sowie Ziege-Anti-Kaninchen) Antikörper konjugiert mit einem patentgeschützten Hapten („HQ“) der Firma Ventana

OptiView HRP Multimer: monoklonaler Anti-HQ Maus-Tertiärantikörper markiert mit HRP (Horseradish Peroxidase)

OptiView Amplification Kit (1. Amplifier, 2. Multimer: patentgeschütztes System, reagiert mit bereits gebundener HRP und legt weitere Hapten (HQ) Bindungsstellen an, die dann vom Multimer (wiederum mit mehreren HRP konjugiert) gebunden wird. Dies führt zu einer Signalamplifikation, da mehr HRP am Immunkomplex gebunden vorliegt, und mehr DAB umgesetzt werden kann.

2.5.2 Western Blot

Da es sich bei dieser Studie auch um eine Validierungsstudie handelt, wurde ein Western-Blot aus Gründen der Vollständigkeit durchgeführt, um zu zeigen, ob der Antikörper auch tatsächlich BRAF-V600E und nicht irgendetwas anderes bindet. Der Western Blot wurde jedoch nicht vom Autoren dieser Doktorarbeit, sondern von Frau Dr. Olga Ritz durchgeführt. Sein Ergebnis spielt für die Studie eine untergeordnete Rolle, wurde aber ebenfalls aus Gründen der Vollständigkeit im Anhang mit aufgeführt und in der Diskussion der Arbeit behandelt. Er wurde nach einem bereits etablierten Protokoll (Ritz et al., 2008) durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie Colo-205 (*BRAF* mutiert), als Negativkontrolle die Zelllinie Karpas-1718 (*BRAF* Wildtyp) und als Positivkontrolle (Ladekontrolle) Actin. Für die Immundetektion wurde noch VE1 aus dem Überstand der Hybridomzelllinie aus der Arbeitsgruppe der Erstbeschreiber des Antikörpers Capper et al. verwendet.

2.5.3 *DNA-Extraktion und BRAF V600E Genotypisierung*

Die Pyrosequenzierungsergebnisse stammen aus der Routinediagnostik durch die Arbeitsgruppe von Prof. Ralf Marienfeld und die Firma Varionostic und lagen dem Verfasser dieser Arbeit insofern vor, als dass in die Kohorte überwiegend Haarzell-Leukämien, SMZL und Melanome mit bereits erfolgter Sequenzierung aufgenommen wurden. Lediglich für 2 noch nicht typisierte Fälle wurde die PCR von Hanns-Christian Dinges unter der Aufsicht von Dr. Jochen Lennerz zur Vervollständigung durchgeführt.

Dabei wurde mit folgendem Protokoll gearbeitet:

Mastermix: (pro Probe + Negativkontrolle)

- 5 µl 10x PCR Pufferlösung
- 0,5 µl PCR-Primer Mix
- 0,5 µl dNT Mix (Art.-Nr. 28-4065-57 GE Healthcare)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5U illustra rTaq Polymerase GE Healthcare)
- 45 µl Millipore H₂O
- 3 µl Lysat bzw. Negativkontrolle

PCR:

- Thermocycler (MWG-Biotech Primus 96 Plus Thermal Cycler) vorheizen auf 95°C.
- Programm: (touch-down 35)
 - 95°C für 5 Minuten
 - 2x [95°C 30 Sekunden, 62°C 30 Sekunden, 72°C 30 Sekunden]

- 2x [95°C 30 Sekunden, 60°C 30 Sekunden, 72°C 30 Sekunden]
- 2x [95°C 30 Sekunden, 58°C 30 Sekunden, 72°C 30 Sekunden]
- 35x [95°C 30 Sekunden, 58°C 30 Sekunden, 72°C 30 Sekunden]
- 72°C für 5 Minuten
- 10°C halten

Für die PCR wurden die Primer: F-5'- TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3' und R-5'-AGCATCTCAGGGCCAAAAAT-3' verwendet. Für die Pyrosequenzierung wurde das Material an eine externe Firma (Varionostic) verschickt. Dort wurden der Sequenzierungsprimer R-5'-GACCCACTCCATCGAG-3' und ein PyroMark Q24 (Qiagen, Hilden, Germany) Sequenzierer verwendet.

2.6 Statistische Analyse

2.6.1 Intraklassen-Korrelationskoeffizient

Um die Ergebnisse der manuellen Immunhistochemie mit denen der automatisierten Färbung und der Pyrosequenzierung besser vergleichen zu können, wurde der Intraklassen-Korrelationskoeffizient berechnet. Mit diesem kann die Zuverlässigkeit von Testmethoden anhand ihrer Übereinstimmung gemessen werden, ohne eine der Methoden als Goldstandard anzusehen. Der Übereinstimmungskoeffizient κ (Kappa) kann Werte von -1 bis 1 annehmen. Geht man davon aus, dass 2 oder mehr Beurteiler (rater) in einer Folge von Beurteilungen nur so häufig zu einem gleichen Ergebnis kommen, wie es durch den Zufall allein passieren würde, entspricht die Übereinstimmung dem Wert 0. Stimmen die Beurteiler immer exakt überein, ergibt sich ein Wert von 1. Und entscheiden sie immer Unterschiedlich (sogar gegen den Zufall) ergibt sich daraus der Wert -1. Die Intraklassen Übereinstimmung wurde erstmalig von J. Cohen 1960 beschrieben, für mehrere Beurteiler wurde sie erstmalig von Shrout, P. E. und Fleiss, J. L. (1979) beschrieben. Die Klassifikation von

Landis und Koch (1977) dient als Standard für die Interpretation des berechneten Koeffizienten κ .

0 oder <0 → keine oder gegensätzliche Übereinstimmung

0.1 – 0.20 → minimale Übereinstimmung

0.21 – 0.40 → schwache Übereinstimmung

0.41 – 0.60 → mäßige Übereinstimmung

0.61 – 0.80 → starke Übereinstimmung

0.81 – 1.00 → fast vollkommene Übereinstimmung

Die Berechnung der Übereinstimmung der einzelnen Testverfahren (manuelle IHC, automatisierte IHC und Pyrosequenzierung) untereinander erfolgte mithilfe des „inter assay agreement“ Tool Kits der Webseite der Universität Hongkong (Link im Literaturverzeichnis).

2.6.2 Youden Index

Um die jeweilige Testperformance der Methoden besser beurteilen zu können wurde außerdem der Youden Index berechnet. Er wird folgendermaßen berechnet.

$$\text{Youden Index} = (\text{Sensitivität [\%]} + \text{Spezifität [\%]} - 100) / 100$$

Als Indexwert ohne Einheit kann er Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Je näher er an 1 liegt, desto besser ist der Test. Werte unter 1 sind für diagnostische Tests in der Regel nicht ausreichend.

3 Ergebnisse

Die empirische Erarbeitung des Protokolls für eine manuelle BRAF-V600E Immunhistochemie ergab, dass eine spezifische manuelle Färbung mit dem VE1 Antikörper möglich ist. Die getesteten Variablen hatten unterschiedlich großen Einfluss auf das Färbungsergebnis und werden im Folgenden in der Reihenfolge, in der sie im Protokoll bearbeitet werden besprochen. Die besten Ergebnisse der hitzeinduzierten Epitopdemaskierung wurden mittels Dampfgeräts in EDTA Puffer pH 8,0 erzielt. Citrat Puffer mit demselben pH zeigte hier schlechtere Ergebnisse und sämtliche Pufferlösungen mit pH 6,0 (TRS und Citrat) funktionierten in den hier mit VE1 durchgeführten Versuchen nicht. Inkubationszeit und -temperatur spielten eine eher untergeordnete Rolle bezogen auf das Färbungsergebnis, die Verdünnung des Primärantikörpers war bis auf 1:100 möglich. Entscheidend für die wiederholbare und korrekt nach richtig positiv (true positive) und richtig negativ (true negative) klassifizierende Färbung war die Wahl des Detektionssystems. In dieser Studie funktionierte der VE1 Antikörper nur in Kombination mit Peroxidase (HRP) als Detektionssystem zufriedenstellend, mit Alkalischer Phosphatase konnte nur in einem Fall eine korrekte Unterscheidung zwischen *BRAF* V600E-mutiertem und Wildtyp Malignem Melanom gemacht werden, die sich jedoch nicht an anderen Proben wiederholen ließ. Mit dem im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Protokoll ließen sich dann konstante, gut differenzierende Färbungen von Malignen Melanomen, Splenischen Marginalzonen Lymphomen und Haarzell-Leukämien durchführen. Abb. 2 A zeigt eine Knochenmarkstanzbiopsie, aus der mittels Pyrosequenzierung eine Allelfrequenz von 14% *BRAF*-V600E ermittelt wurde und man erkennt die mittels Peroxidase braun angefärbten, neoplastischen Infiltrate sehr gut. Eine gelungene Färbung kann als homogen zytoplasmatisch in mutierten Zellen beschrieben werden. Unspezifische Hintergrundfärbung war mit dem beschriebenen Protokoll kaum zu beobachten, tumorfreie Areale zeigten in der Regel keine Färbung. In bereits nekrotischen Tumorregionen zeigte der Antikörper eine geringere Färbungsintensität. Dem Autor sind bezüglich des Färbeverhaltens keine positiven oder negativen Ef-

efekte der Zwischenlagerung von Tagen bis Wochen bei Raumtemperatur aufgefallen, in Proben, die in bereits geschnittener und auf Objektträger gebrachter Form 6 und mehr Monate zwischengelagert worden waren, war keine Färbung mehr möglich (nicht gezeigt). Zwischen initial verwendetem Hybridomzelllinienüberstand der Erstbeschreiber Capper et al. und dem kommerziell erhältlichen Antikörper waren keine Unterschiede bezüglich Färbungsqualität und -verhalten festzustellen.

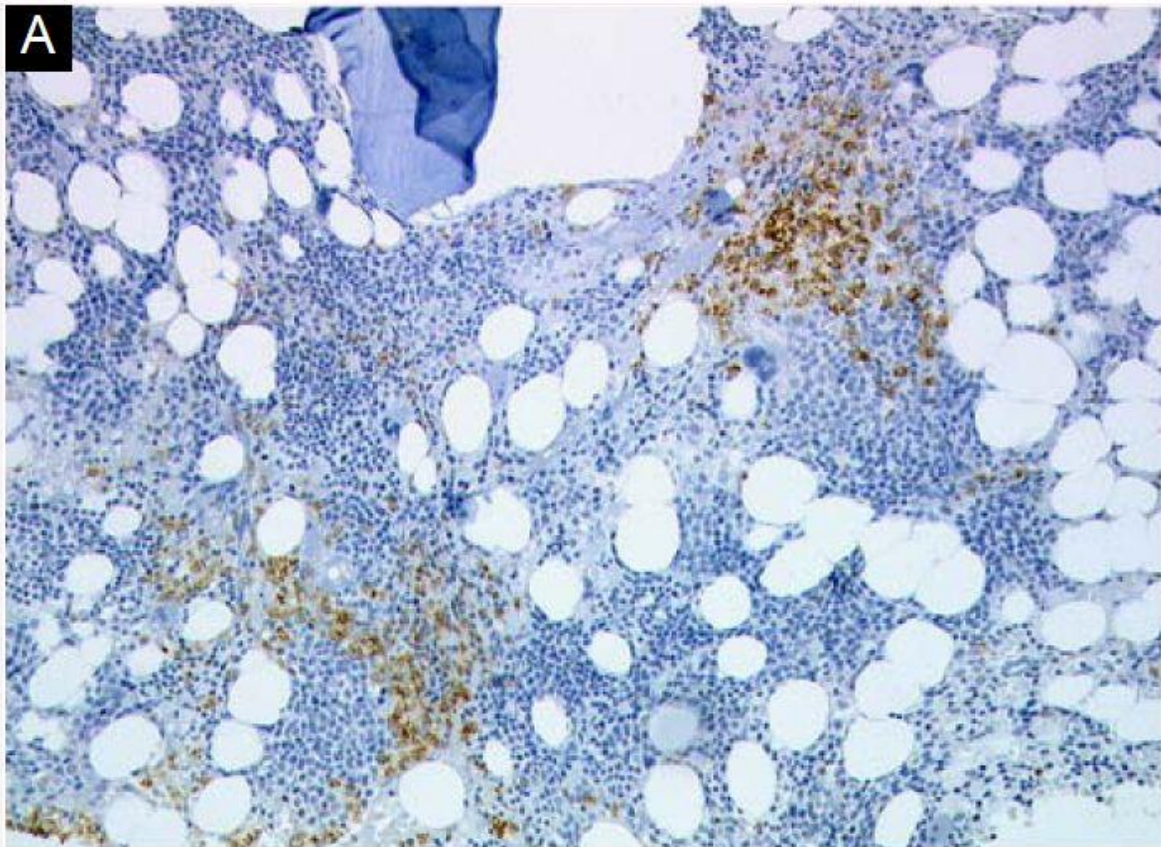
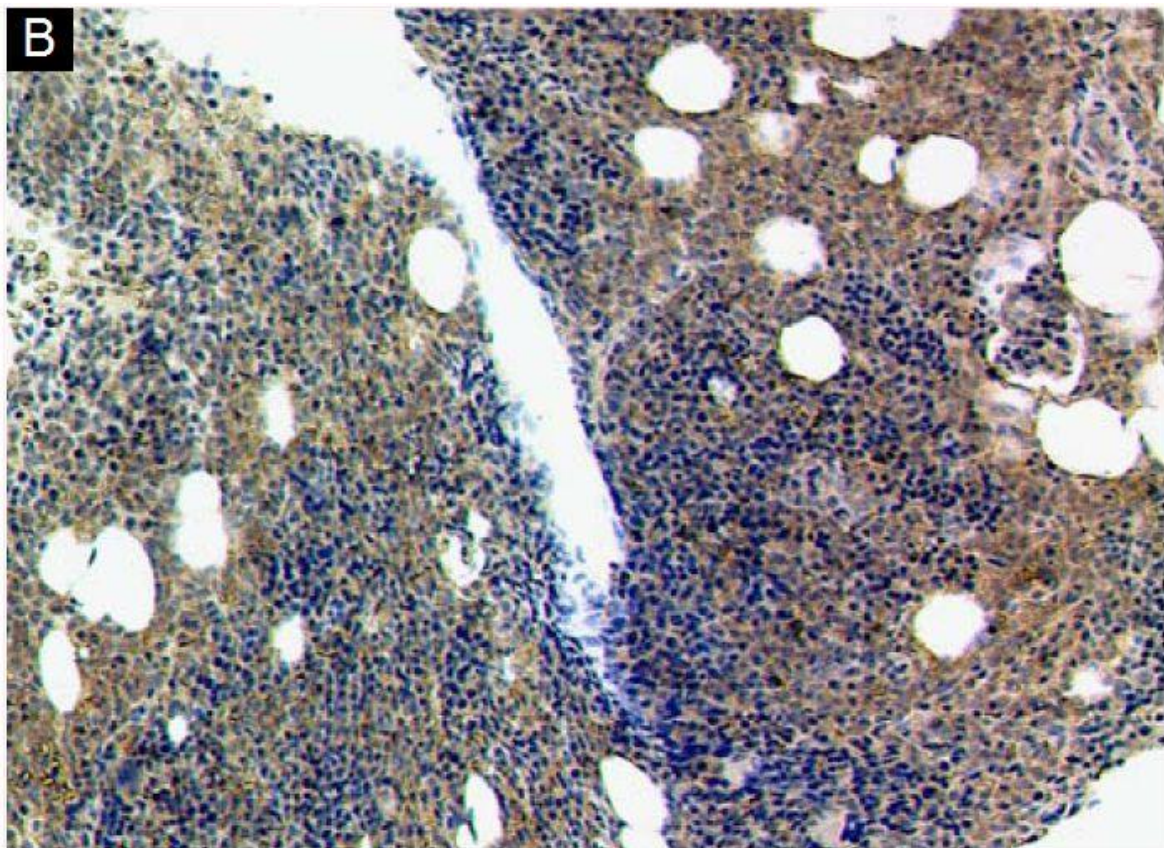


Abbildung 2. Detektion der BRAF-V600E Mutation mittels spezifischer Immunhistochemie. (auch erschienen in Ding et al. 2015)

A. Beispiel einer BRAF-V600E mutationsspezifischen Immunhistochemie in einer dekalzifizierten Knochenmarkbiopsie mit neoplastischen Infiltraten (Allelfrequenz in der PCR 14%, siehe auch Abb. 3)



Von insgesamt 21 *BRAF* V600E mutierten Fällen (19 Klassische Haarzelleukämien und 2 Maligne Melanome) wurden nach manueller Immunhistochemie mit dem VE1 Antikörper 20 als mutiert identifiziert. Für die automatisierte Immunhistochemie lagen nur 17 Klassische Haarzelleukämien vor, von den 19 gefärbten *BRAF* V600E positiven Fällen wurden hier 18 erkannt. Es ergeben sich somit die Sensitivitätskennwerte 95,24% (siehe Tabelle 3) für die manuelle und 94,74% (siehe Tabelle 4) für die automatisierte Färbung. Die 2 Haarzelleukämievarianten, sowie die 6 Splenischen Marginalzonenlymphome und die 2 Wildtypmelanome zeigten Immunonegativität für den *BRAF* V600E spezifischen Antikörper und wurden dem Pyrosequenzierungsergebnis entsprechend korrekt klassifiziert. Es ergibt sich also ein Spezifitätskennwert von 100% für beide Verfahren.

Tabelle 3. Testperformancekennwerte für die manuelle Immunhistochemie (IHC)

Manuelle IHC	V600E mutiert	Wildtyp
Immunopositiv	20	0
Immunonegativ	1	10
	Sensitivität: 20/21=95,24%	Spezifität: 10/10=100%

Tabelle 4. Testperformancekennwerte für die automatisierte Immunhistochemie (IHC)

Automatisierte IHC	V600E mutiert	Wildtyp
Immunopositiv	18	0
Immunonegativ	1	10
	Sensitivität: 18/19=94,74%	Spezifität: 10/10=100%

Die 2 *BRAF* V600K mutierten Malignen Melanome blieben sowohl in der manuellen, als auch in der automatisierten Immunhistochemie immunonegativ. Eine Klassische

Haarzellleukämie, die aufgrund zu geringer Mengen von DNA in der Probe in der Pyrosequenzierung als nicht-informativ klassifiziert worden war, konnte sowohl in der manuellen, als auch in der automatisierten immunhistochemischen Färbung eindeutig als *BRAF* V600E mutiert identifiziert werden (siehe Abb. 2 B und Abb. 3).

Legt man zur Bewertung dieser Ergebnisse die Klassifizierung in *BRAF* V600E positiv und *BRAF* V600E negativ zugrunde, ergibt sich daraus in der Intraklassen-Korrelation für alle 3 Methoden ein ICC-Wert von 0,96 („fast vollkommene“ Übereinstimmung). Legt man dagegen die Klassifizierung in *BRAF* mutiert vs. Wildtyp zugrunde, muss man berücksichtigen, dass die beiden immunhistochemischen Verfahren, die 2 *BRAF* V600K mutierten Malignen Melanome nicht als solche erkannt haben. Es ergeben sich dann natürlich andere Werte für die Sensitivität (86,96% für die manuelle, 85,71% für die automatisierte Färbung). Die Spezifität bleibt hiervon unbeeinflusst. In der Intraklassen-Korrelation ergibt sich dann ein Kennwert von 0,92. Diese Berechnungen vereinen alle 3 Methoden. Man kann die Intraklassen-Korrelation auch nur für die beiden Methoden manuelle Immunhistochemie und Pyrosequenzierung ausrechnen, mit 0,75-0,85 (mit und ohne V600K Detektion als Kriterium) fällt diese dann niedriger aus, da die Unterschiede zwischen 2 ratern in der Berechnung größere Auswirkungen haben, als einzelne „Ausreißer“ eines raters. Diese Werte entsprechen allerdings immer noch einer „starken“ Übereinstimmung nach Landis und Koch.

Der Youden Index für die manuelle und automatisierte Immunhistochemie war ohne V600K Erkennung 0,95, schließt man sie mit ein lag er bei 0,87 für manuelle und 0,86 für automatisierte IHC.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der immunhistochemische Nachweis von *BRAF* V600E mit dem monoklonalen Maus-Antikörper VE1 auch auf manuellem Weg möglich ist. Die Qualität der Färbung und die Testperformance der Methode wird durch den Verzicht auf den Ventana BenchMark XT Autostainer nicht beeinträchtigt. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierung hat

keine der Methoden eine 100%ige Sensitivität für BRAF V600E und die Kennwerte liegen sehr dicht beieinander.

4 Diskussion

In dieser Studie wurde erstmals gezeigt, wie man mit dem BRAF V600E spezifischen monoklonalen Mausantikörper VE1 eine manuelle immunhistochemische Färbung durchführen kann. Im Abschnitt Material und Methoden der Dissertation wurde dazu beschrieben, wie ein Protokoll für die manuelle Immunhistochemie erarbeitet worden ist, mit dem BRAF V600E mutierte Proben richtig positiv und BRAF Wildtyp Proben richtig negativ klassifiziert werden können. Fehlschläge und Sackgassen auf dem Weg zu einem korrekt klassifizierenden Protokoll sind beschrieben worden und können verschiedene Gründe haben. Durch die Fixierung der Gewebe in Formalin werden Proteine denaturiert und Quervernetzungen zwischen ihnen hergestellt, die durch die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung in Pufferlösung wieder rückgängig gemacht und gelöst werden sollen. Wie gut oder schlecht dies gelingt, hängt vom jeweiligen Protein und vom gewählten Verfahren für das Antigen retrieval ab. Mit Blick auf die hier gewonnenen Färbungsergebnisse renaturiert das BRAF V600E Protein vermutlich besser bei einem pH-Wert von 8,0, als bei pH 6,0 und besser in EDTA Puffer, als in Citrat Puffer. Ebenso ließ sich in dieser Studie der VE1 Antikörper nur bedingt mit Alkalischer Phosphatase detektieren. Hier kam es, nach anfangs kaum positiven Ergebnissen, durch aufwendigeres Antigen retrieval neben den dann richtig positiven auch zu regelhaften falsch positiven Färbungen. Der Grund dafür ist nicht bekannt, möglicherweise liegen hier zwei Störfaktoren gleichzeitig vor. Der erste Störfaktor könnte sein, dass der Antikörper sich überhaupt nicht mit Alkalischer Phosphatase darstellen lässt, weil durch die Bindung an BRAF V600E der biotinylierte Sekundärantikörper nicht mehr an den Fc-Teil von VE1 binden kann. Die entsprechende Bindungsstelle könnte durch die Quartärstruktur des Komplexes verdeckt sein. Da dies allein nur zu einem negativen Färbungsergebnis führen würde, müsste noch ein zweiter Störfaktor vorliegen, zum Beispiel eine unspezifische Hintergrundfärbung durch endogene Alkalische Phosphatase. Dies würde erklären, warum sich zwar eine Färbung mit Alkalischer Phosphatase im Gewebe herbeiführen lässt, diese aber nicht spezifisch für BRAF V600E ist. Geht man umgekehrt davon aus, dass im Immunkomplex aus BRAF V600E die Bindungsstelle

für den peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper noch freiliegt, und dass die endogene Peroxidase in den getesteten Geweben nicht so störend ist, ist zumindest in der Theorie erklärbar, warum die Peroxidase die entscheidende Verbesserung brachte. Für diese These spricht außerdem, dass auch die Immunfluoreszenzversuche wegen zu starker Hintergrundfärbung verworfen werden mussten. Dabei wurde ebenfalls mit einem streptavidinkonjugierten Sekundärantikörper gearbeitet, dessen Bindungsstelle am Primärantikörper verdeckt gewesen sein könnte. Allerdings stammte dieser von einer anderen Firma und bindet womöglich an ganz anderer Stelle im Immunkomplex, als der Sekundärantikörper aus dem Dako Alkalische Phosphatase Kit. Ebenso fällt bei genauerer Betrachtung der Methoden der Arbeitsgruppe Colomba et al. (2013) auf, dass auch sie mit Alkalischer Phosphatase gearbeitet haben und dabei „nicht-interpretierbare“ Ergebnisse in ihrer Kohorte hatten, welche in ihrer Beschreibung viele Parallelen einer falsch positiven Färbung aufweisen. Bei Capper et al. (2013) wird hingegen vermutet, dass falsch positive Ergebnisse des VE1 Antikörpers auch durch eine Bindung ähnlicher Epitope auf den ARAF oder CRAF Proteinen zustande kommen könnten.

Im Zuge der Etablierung des Antikörpers wurde auch ein Western Blot für VE1 angefertigt. Dieser wurde zwar nicht vom Autoren dieser Arbeit, sondern von Frau Dr. Olga Ritz durchgeführt, sein Ergebnis wird aber der Vollständigkeit halber hier vorgestellt. Es zeigte sich eine dicke Bande auf Höhe des Molekulargewichts ~95kDa im *BRAF* V600E mutierten Colo 205 Zelllysate (siehe Anhang), wohingegen diese Bande beim Lysat der Zelllinie K1718 (*BRAF* Wildtyp) nur schwach sichtbar ist. Da für *BRAF* V600E ein Molekulargewicht von ~90-100 kDa angegeben wird, validiert dieses Ergebnis die Beschreibung des Antikörpers in der Publikation von Capper et al., 2011 als *BRAF* V600E-spezifisch bindend.

Eine Beantwortung der Frage, welche Methode (Immunhistochemie oder Genotypisierung) die bessere ist, wird in dieser Dissertation kaum möglich sein. Beide Methoden haben ganz unterschiedliche Vor- und Nachteile, die berücksichtigt werden sollten. Die Immunhistochemie ist eine schnelle, verhältnismäßig günstige Methode,

die es einem erfahrenen Pathologen ermöglicht, ein gefärbtes Präparat zu deuten und eine Diagnose zu stellen. Sie ist immer subjektiv und davon abhängig, wie spezifisch der Antikörper unter den gewählten Bedingungen, die möglichst standardisiert sein sollten, sein Epitop bindet und dort sichtbar gemacht werden kann. Charakteristisch bei dieser Methode ist, dass mit ihr Aussagen über den Mutationsstatus, Tumordichte und Verteilungsmuster auf Zellebene möglich sind. Dies ist für die BRAF Diagnostik zwar nicht entscheidend, wird der Methode allerdings auch auf lange Sicht immer einen Platz in der Forschung auf dem Gebiet der onkogenen BRAF Mutationen sichern, etwa für Kolkalisationsanalysen durch Immunfluoreszenz (Sahm et al., 2012) oder aber durch sequentielle Immunhistochemie. Bei der Sequenzanalyse muss dagegen nur initial Tumorgewebe aus einem Präparat mit hoher Tumordichte entnommen werden. Alles Weitere kann objektiv ausgewertet werden. Die Sequenzanalyse dauert insgesamt länger als die Immunhistochemie und ist die teurere Methode. Außerdem unterliegen DNA und PCR basierte Methoden harten Qualitätskontrollen, die fortlaufend erneuert werden müssen, sie erfordern mehr und kostenintensiveres Equipment und sind in der Durchführung für das Personal technisch anspruchsvoller. Zusätzlich funktionieren nicht alle DNA-basierten Tests in dekalzifizierten oder nicht-formaldehydfixierten Proben.

Um der Antwort auf die Frage nach der besseren Methode näher zu kommen, wurde in dieser Studie nachdem die grundsätzliche Machbarkeit einer manuellen immunhistochemischen Färbung von BRAF V600E gezeigt war, mithilfe einer Kohorte von 33 Fällen die Sensitivität und weitere Kennwerte der Methoden untersucht. Die Ergebnisse wurden dabei mit einer Schnittserie derselben Fälle verglichen, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe des Erstbeschreibers von VE1 Capper et al. in Heidelberg automatisiert gefärbt worden war (nach einem bereits etablierten und veröffentlichten Protokoll). Mit Sensitivitäten im Bereich von 95% liegen automatisierte und manuelle Färbungsergebnisse vernachlässigbar dicht beieinander, jede der beiden Methoden hat einen BRAF V600E positiven Fall fälschlicherweise als negativ klassifiziert. Als erste Schlussfolgerung kann man also festhalten, dass im direkten Vergleich die manuelle Methode und die automatisierte Methode in puncto Aussagekraft und Qualität gleichwertig sind.

Beim anschließenden Vergleich der Ergebnisse der Pyrosequenzierung aus der Routinediagnostik, welche schon zu Beginn der Studie vorlagen, fällt vor allem auf, dass auch die Pyrosequenzanalyse in einem Fall „nicht-informativ“ war. Die Diagnose einer klassischen Haarzelleukämie wurde in diesem Fall aufgrund anderer B-Zell Oberflächenmarker und aufgrund der Zellmorphologie gestellt, da vermutlich nicht genug mutierte DNA in der Probe vorhanden war. Interessant ist, dass dieser Fall jedoch sowohl mit manueller, als auch mit automatisierter Immunhistochemie eindeutig und unabhängig voneinander als BRAF V600E positiv identifiziert werden konnte. Der Fall muss somit für die Pyrosequenzierung, die für die Antikörperetablierung noch als Goldstandard diente, im Vergleich der 3 Methoden rückblickend als ein falsch negatives Ergebnis in der Kohortenstudie gewertet werden. Einige Autoren, die den VE1 Antikörper erfolgreich einsetzen konnten (Andrulis et al., 2012; Bosmuller et al., 2013; Colomba et al., 2013; Long et al., 2013; Marin et al., 2014) sehen in ihm eine geeignete Alternative zur Sequenzanalyse in der BRAF Diagnostik. Diese Ansicht wurde bereits von Adackapara et al. (2013) und Sperveslage et al. (2013) in Frage gestellt und auch die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie können die Immunhistochemie nicht als eigenständige Alternative zur Sequenzanalyse empfehlen. Man kann mithilfe der Immunhistochemie nur die mutierten Proteine detektieren, gegen die es mutationsspezifische Antikörper gibt. Bezogen auf die BRAF Diagnostik bedeutet das, dass man zwar BRAF V600E und damit 95% aller BRAF Mutationen detektieren kann, nicht aber die restlichen BRAF Mutationen, wie zum Beispiel V600K oder V600R. Da diese allerdings auch von erheblicher klinischer Relevanz sind, muss die Diagnostik auch diese Mutationen miterfassen. So sind BRAF V600K Mutationen ebenfalls mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und schlechter Prognose assoziiert (zum Beispiel in Malignen Melanomen, Menzies et al., 2012), können darüber hinaus aber durchaus erfolgreich mit den BRAF Inhibitoren therapiert werden (Rubinstein et al.). Dies gilt ebenso für V600R Mutationen (Koch et al.). Es sind zwar auch Studien publiziert, in denen auch BRAF V600R (Ihle et al., 2014) und BRAF V600K (Heinzerling et al., 2013) erfolgreich mit dem VE1 Antikörper detektiert wurden, was darauf hindeutet, dass die Konformation dieser Proteine der von BRAF V600E sehr ähnlich ist, in den beiden V600K mutierten Proben der hier vorliegenden Studienkohorte gelang dies jedoch nicht. Auch gibt es

noch keine Zulassung für die Therapie anderer Mutationen als V600E mit Inhibitoren, die Kosten würden somit nicht von der Krankenkasse übernommen, trotzdem muss man vor diesem Hintergrund der Pyrosequenzierung einen entscheidenden Vorteil bezüglich der umfassenderen Möglichkeiten in der Diagnostik einräumen.

Vergleicht man also die Testperformance von Immunhistochemie und anderen Methoden, muss die Restriktion auf die V600E Mutation berücksichtigt werden. In dieser Kohorte wurde mittels Pyrosequenzierung, manueller und automatisierter Immunhistochemie jeweils dieselbe Anzahl V600E mutierter Fälle nicht erkannt, nämlich ein Fall mit jeder Methode. Da es sich bei den nicht erkannten Fällen jedoch nicht um immer denselben Fall handelte, liegt der Schluss nahe, dass Pyrosequenzierung und Immunhistochemie in der *BRAF* Diagnostik parallel angewendet werden sollten, um bestmögliche Ergebnisse bei der BRAF Diagnostik zu erzielen. Der Zeit- und auch der Kostenfaktor sind bei einer Diagnosestellung wie der BRAF V600E-Positivität oder -Negativität für einen Patienten, der bereits die Diagnose eines Malignoms erhalten hat, von untergeordneter Bedeutung. In einem solchen Fall geht es in erster Linie darum, die Mutation mit höchstmöglicher Sensitivität und Spezifität zu erkennen, um die Option einer zielgerichteten Therapie (engl. targeted therapy) mit einem BRAF Inhibitor (Vemurafenib oder Dabrafenib) aufzuzeigen. In der Studie von Chapman et al. (2011) sprachen 48% der Patienten auf eine Therapie mit Vemurafenib an, nur 5% dagegen im Studienarm, der mit Decarbazin (Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylantien) behandelt wurde. Schon nach 6 Monaten lag das Gesamtüberleben im Vemurafenibarm mit 84% deutlich über dem der Decarbazingruppe (64%) und auch ein späterer Wechsel in den Vemurafenibarm brachte noch eine Verbesserung des Krankheitsverlaufs. Die zielgerichtete Therapie mit den Inhibitoren ist mittlerweile in Deutschland zugelassen, jedoch noch extrem teuer. Die Monatstherapiekosten betragen rund 8.500€ für Dabrafenib, Tafinlar® und 12.500€ für Vemurafenib, Zelboraf® Dies sind Angaben der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (Links im Literaturverzeichnis). Trotz der hohen Kosten können diese Therapiekosten auf Antrag und mit spezieller Genehmigung im Vorfeld jedoch von der gesetzlichen Krankenkasse übernommen werden

und stellen somit eine reale Therapieoption für Patienten dar, bei denen die *BRAF* V600E Mutation nachgewiesen werden kann.

Um die Diskussion zu objektivieren, muss man trotz aller Unterschiede und der jeweiligen Vor- und Nachteile der Methoden sagen, dass die Intraklassen-Korrelation für alle 3 Methoden insgesamt sehr hoch ist. Für die V600E Detektion allein liegt sie bei 0,96 („fast vollkommene“ Übereinstimmung nach Landis und Koch), berechnet man sie für die Detektion aller *BRAF* Mutationen liegt sie mit 0,92 zwar immer noch sehr hoch, deutlich werden die Unterschiede dann aber bei der Sensitivitätsberechnung. Mit nur rund 86-87% Sensitivität der Immunhistochemie für alle *BRAF* mutierten Fälle der Kohorte nimmt ihr diagnostischer Wert natürlich erheblich ab, ist aber immer noch durchaus akzeptabel. Abgesehen davon ist eine derartige Berechnung der Kennwerte allerdings auch nicht sonderlich sinnvoll, da die Immunhistochemie im Hinblick auf die Erkennung verschiedener Mutationen mit demselben Antikörper, wie bereits erwähnt, naturgemäß schlechter abschneiden muss. Bei einer Sensitivität von etwa 95%, wie sie die Immunhistochemie und virtuell auch die Pyrosequenzierung durch den nicht-informativen Fall in dieser Studie für *BRAF* V600E erreichten und 100% Spezifität, liegt der Youden Index der Methoden mit 0,95 ebenfalls sehr hoch. Man kann also zu dem Schluss gelangen, dass jede der Methoden für sich allein eine ausreichende diagnostische Performance bietet, um sie allein als Standard einzusetzen. Allerdings werden bei einer Sensitivität von 95% immer noch 5% der in Wahrheit mutierten Fälle nicht als solche erkannt. Das scheint auf den ersten Blick wenig, in der klinischen Praxis ist das jedoch jeder zwanzigste Patient, der so einer möglichen zielgerichteten Therapie nicht zugeführt werden kann. Führt man beide Methoden durch, erkennt man damit von den 5%, die eine Methode allein verfehlt hätte, wiederum 95%. Diese Berechnung ist sinnvoll, da jede der 3 Methoden einen anderen *BRAF* V600E mutierten Fall in der Kohortenstudie nicht erkannt hat, der dann aber von der jeweils anderen Methode problemlos identifiziert werden konnte. So können 4,75% der 5% doch noch korrekt klassifiziert und gegebenenfalls therapiert werden. Auf die Gesamtheit bezogen werden dann 99,75% der Patienten richtig diagnostiziert und nur noch jeder vierhundertste Patient mit einem *BRAF* V600E mutierten Malignom entgeht der Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie.

Rechnet man mit 87% Sensitivität für alle Mutationen bei der Immunhistochemie, klassifiziert man immer noch 99,35% der Patienten korrekt, wenn man in der Diagnostik Immunhistochemie und Pyrosequenzierung kombiniert. Und wenn man darüber hinaus noch als erstes die Immunhistochemie sozusagen als schnellen und günstigen Screening-Test verwendet und die Sequenzanalyse nur bei negativem oder nicht-eindeutigem Ergebnis ergänzend einsetzt, kann man die höchste Sensitivität bei gleichzeitig höchster Kosteneffizienz erreichen.

In dieser Studie wurde gezeigt, wie man mittels manueller Immunhistochemie die *BRAF* V600E Mutation sensitiv nachweisen kann. Das präsentierte Protokoll soll es anderen Laboren, die nicht über ein automatisiertes Färbesystem verfügen, erleichtern, den VE1 Antikörper in ihre *BRAF* Diagnostik zu implementieren. Aufgrund der Tatsache, dass jede der drei Methoden (manuelle und automatisierte IHC, sowie Pyrosequenzierung) einen Fall nicht erkannt hat, wobei es jedoch jedes Mal einen anderen Fall handelte, gelange ich auch vor dem Hintergrund der hohen klinischen Relevanz der *BRAF* Diagnostik, zu dem Schluss, dass sich Immunhistochemie und Sequenzanalyse ergänzen sollten, um die höchstmögliche Sensitivität zu erreichen.

Abschließend kann die Frage, welches immunhistochemische Verfahren die besten testanalytischen Kennwerte im Vergleich zur DNA-basierten Genotypisierung aufweist wie folgt beantwortet werden. Manuelle und automatisierte Immunhistochemie sind für die *BRAF* Diagnostik gleich sensitiv und spezifisch. Mit 95%iger Sensitivität für *BRAF* V600E liegen sie sogar mit der Pyrosequenzierung gleichauf. Andere *BRAF* als V600E Mutationen konnten in dieser Studie nicht immunhistochemisch detektiert werden.

5 Zusammenfassung

BRAF ist die B-Isoform der RAF Kinase, welche Teil des MAP-Kinase-Signalwegs ist und die Zellproliferation reguliert. Sie ist als Protoonkogen anfällig für Mutationen, die zur Entstehung von Malignomen führen können. Über 95% der Mutationen des *BRAF* Gens macht die *BRAF* V600E Mutation aus. Sie lässt sich in verschiedensten humanen Krebsarten nachweisen und ist eine der häufigsten Mutationen in Malignem Melanom (44%), papillärem Schilddrüsenkarzinom (52%) und Klassischer Haarzellleukämie (100%). Wird sie nachgewiesen, muss man davon ausgehen, dass sie teil- oder möglicherweise sogar hauptverantwortlich für die Entstehung des Malignoms ist, und eine zielgerichtete Therapie (targeted therapy) mit einem Inhibitor gegen das mutierte Protein ist zu erwägen. Häufig stoppt eine solche Behandlung den Tumorprogress und es gibt eindeutige Evidenz, dass dadurch die Mittlere, sowie die Gesamtüberlebensrate signifikant erhöht werden können. Im Focus der Diskussion um die geeignete BRAF Diagnostik steht neben sequenzanalytischen Verfahren auch der Mutationsnachweis auf Zellebene mittels Immunhistochemie. In der hier vorgelegten Arbeit wurde erstmals gezeigt, wie man BRAF V600E manuell mittels Immunhistochemie nachweisen kann, und es wurde anhand einer Kohorte aus 33 Fällen erörtert, wie sensitiv und spezifisch dieses Verfahren im Vergleich zu bereits etablierten immunhistochemischen Protokollen arbeitet, die allerdings nur für automatisierte Färbesysteme publiziert sind. Ferner wurde die Methode mit Pyrosequenzergebnissen der Kohorte verglichen, die aus der Klinikroutine der Uniklinik Ulm stammen. Die empirische Protokollentwicklung ergab, dass sich der diagnostische BRAF V600E spezifische Antikörper am besten nach einer hitzeinduzierten Epitopdemaskierung in EDTA Puffer pH 8,0 im Dampfgerät und einer Detektion mittels Peroxidase sichtbar machen lässt. Dies gelingt auch bei formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Proben, die zuvor dekalzifiziert wurden. Zur Primärantikörperinkubation sind Verdünnungen bis 1:100 möglich, ohne Verluste bei der Färbungsintensität hinnehmen zu müssen. In der anschließenden Validierung des Protokolls mittels Kohortenstudie zeigte sich, dass sowohl die manuelle, als auch die in

Heidelberg von der Arbeitsgruppe des Erstbeschreibers des Antikörpers durchgeführte automatisierte Färbung insgesamt mit 95%iger Sensitivität und 100%iger Spezifität sehr gut funktionierten, jedoch pro Methode einen mutierten Fall nicht korrekt klassifizieren konnten. Interessanterweise konnte aber auch die Pyrosequenzierung in einem Fall keine Aussage zum Mutationsstatus der Probe machen und erreichte somit auch nur eine Sensitivität von 95% in der Studienkohorte. Da jede der Methoden einen anderen mutierten Fall nicht erkannt hat, und vor dem Hintergrund der klinischen Relevanz einer möglichst sensitiven Diagnostik der Mutation, lautet die Schlussfolgerung dieser Arbeit, dass beide Verfahren (Immunhistochemie und Pyrosequenzierung) sequentiell und sich gegenseitig ergänzend eingesetzt werden sollten. Trotz guter Ergebnisse bei der BRAF V600E Detektion, muss man allerdings die Limitation der Immunhistochemie auf die V600E Mutation berücksichtigen. Der zwar insgesamt geringe Anteil von unter 5% bzw. je nach Malignom auch bis zu 10% (Malignes Melanom) betragende Anteil anderer *BRAF* Mutationen als V600E, beispielsweise V600K, konnte mit dem hier verwendeten Antikörper nicht detektiert werden. Obwohl Fälle beschrieben sind, in denen eine Färbung anders mutierter BRAF Proteine auch mit dem V600E spezifischen Antikörper gelungen ist, können diese Mutationen, wie auch in dieser Studie, in der Regel nur mittels Sequenzanalyse nachgewiesen werden. Und da Malignompatienten mit anderen *BRAF* Mutationen als V600E ebenfalls von den Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib profitieren können, bleibt für die sichere Identifikation in diesen seltenen Fällen bisher nur die Sequenzanalyse übrig.

6 Literaturverzeichnis

Publikationen

1. Adackapara, C. A., Sholl, L. M., Barletta, J. A., Hornick, J. L. (2013). Immunohistochemistry using the BRAF V600E mutation-specific monoclonal antibody VE1 is not a useful surrogate for genotyping in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology*, 63, 187-193.
2. Affolter, K., Samowitz, W., Tripp, S., Bronner, M. P. (2013). BRAF V600E mutation detection by immunohistochemistry in colorectal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 52, 748-752.
3. Andrulis, M., Penzel, R., Weichert, W., von Deimling, A., Capper, D. (2012). Application of a BRAF V600E mutation-specific antibody for the diagnosis of hairy cell leukemia. *The American journal of surgical pathology*, 36, 1796-1800.
4. Bosmuller, H., Fischer, A., Pham, D. L., Fehm, T., Capper, D., von Deimling, A., Bonzheim, I, Staebler, A, Fend, F. (2013). Detection of the BRAF V600E mutation in serous ovarian tumors: a comparative analysis of immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody and allele-specific PCR. *Human Pathology*, 44, 329-335.
5. Capper, D., Preusser, M., Habel, A., Sahm, F., Ackermann, U., Schindler, G., Pusch, S., Mechttersheimer, G., Zentgraf, H., von Deimling, A. (2011). Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta neuropathologica*, 122, 11-19.
6. Capper, D., Voigt, A., Bozukova, G., Ahadova, A., Kickingereeder, P., von Deimling, A., von Knebel Doeberitz, M., Kloor, M. (2013). BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal

cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 133, 1624-1630.

7. Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S.J., Sosman, J.A., Kirkwood, J.M., Eggermont, A.M., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, R.J., Flaherty, K.T., McArthur, G.A.; BRIM-3 Study Group. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine*, 364, 2507-2516.
8. Cohen, J.: A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*. 20, 1960, 37-46.
9. Colomba, E., Helias-Rodzewicz, Z., Von Deimling, A., Marin, C., Terrones, N., Pechaud, D., Capper, D., Blons, H., Zimmermann, U., Clerici, T., Saiag, P., Emile, J.F. (2013). Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 15, 94-100.
10. Curry, J. L., Torres-Cabala, C. A., Tetzlaff, M. T., Bowman, C., Prieto, V. G. (2012). Molecular platforms utilized to detect BRAF V600E mutation in melanoma. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 31, 267-273.
11. Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber,

- B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, 949-954.
12. Day F, Muranyi A, Singh S, Shanmugam K, Williams D, Byrne D, Pham K, Palmieri M, Tie J, Grogan T, Gibbs P, Sieber O, Waring P, Desai J (2015). A mutant BRAF V600E-specific immunohistochemical assay: correlation with molecular mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. *Target Oncol.* 10:99-109
 13. Dienstmann, R., Tabernero, J. (2011). BRAF as a target for cancer therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.*, 11, 285-295.
 14. Dinges HC, Capper D, Ritz O, Brüderlein S, Marienfeld R, von Deimling A, Möller P, Lennerz JK. (2015) Validation of a Manual Protocol for BRAF V600E Mutation-specific Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*; 23: 382-8.
 15. Heinzerling, L., Kuhnappel, S., Meckbach, D., Baiter, M., Kaempgen, E., Keikavoussi, P., Schuler, G., Agaimy, A., Bauer, J., Hartmann, A., Kiesewetter, F., Schneider-Stock, R. (2013). Rare BRAF mutations in melanoma patients: implications for molecular testing in clinical practice. *British journal of cancer*, 108, 2164-2171.
 16. Hoeflich, K. P., Herter, S., Tien, J., Wong, L., Berry, L., Chan, J., O'Brien, C., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Lackner, M., Stern, H., Choo, E., Murray, L., Friedman, L.S., Belvin, M. (2009). Antitumor efficacy of the novel RAF inhibitor GDC-0879 is predicted by BRAFV600E mutational status and sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway suppression. *Cancer research*, 69, 3042-3051.

17. Ihle, M. A., Fassunke, J., König, K., Grunewald, I., Schlaak, M., Kreuzberg, N., Tietze, L., Schildhaus, H.U., Büttner, R., Merkelbach-Bruse, S. (2014). Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BioMed Central cancer* 14
18. Klein O, Clements A, Menzies AM, O'Toole S, Kefford RF, Long GV. (2013) BRAF inhibitor activity in V600R metastatic melanoma--response. *Eur J Cancer*;49:1797-8.
19. Landis, J. R. Koch, G. G.: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33, 1977, 159–174.
20. Lennerz, J. K., Klaus, B. M., Marienfeld, R. B., Moller, P. (2012). Pyrosequencing of BRAF V600E in routine samples of hairy cell leukaemia identifies CD5+ variant hairy cell leukaemia that lacks V600E. *British journal of haematology*, 157, 267-269.
21. Long, G. V., Wilmott, J. S., Capper, D., Preusser, M., Zhang, Y. E., Thompson, J. F., Kefford, R.F., von Deimling, A., Scolyer, R. A. (2013). Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *The American journal of surgical pathology*, 37, 61-65.
22. Loughrey, M. B., Waring, P. M., Tan, A., Trivett, M., Kovalenko, S., Beshay, V., Young, M.A., McArthur, G., Boussioutas, A., Dobrovic, A. (2007). Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Familial cancer*, 6, 301-310.
23. Mader, A., Bruderlein, S., Wegener, S., Melzner, I., Popov, S., Müller-Hermelink, H. K., Barth, T.F., Viardot, A., Moller, P. (2007). U-HO1, a new cell line derived

from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenetic and genome research*, 119, 204-210.

24. Marin, C., Beauchet, A., Capper, D., Zimmermann, U., Julie, C., Ilie, M., Saiag, P., von Deimling, A., Hofman, P., Emile, J. F. (2014). Detection of BRAF p.V600E Mutations in Melanoma by Immunohistochemistry Has a Good Interobserver Reproducibility. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 138, 71-75.
25. McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Abrams, S. L., Lee, J. T., Chang, F., Bertrand, F. E., Navolanic, P.M., Terrian, D.M., Franklin, R.A., D'Assoro, A.B., Salisbury, J.L., Mazzarino, M.C., Stivala, F., Libra, M. (2006). Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in enzyme regulation*, 46, 249-279.
26. Menzies, A. M., Haydu, L. E., Visintin, L., Carlino, M. S., Howle, J. R., Thompson, J. F., Kefford, R.F., Scolyer, R.A., Long, G. V. (2012). Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18, 3242-3249.
27. Millington, G. W. (2013). Mutations of the BRAF gene in human cancer, by Davies et al. (Nature 2002; 417: 949-54). *Clinical and experimental dermatology*, 38, 222-223.
28. Parsons, M. T., Buchanan, D. D., Thompson, B., Young, J. P., Spurdle, A. B. (2012). Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *Journal of medical genetics*, 49, 151-157.

29. Puzanov I, Amaravadi RK, McArthur GA, Flaherty KT, Chapman PB, Sosman JA, Ribas A, Shackleton M, Hwu P, Chmielowski B, Nolop KB, Lin PS, Kim KB (2015). Long-term outcome in BRAF(V600E) melanoma patients treated with vemurafenib: Patterns of disease progression and clinical management of limited progression. *Eur J Cancer*. 51:1435-43
30. Pyo JS, Sohn JH, Kang G (2016). Diagnostic Accuracy of BRAF Immunohistochemistry in Colorectal Cancer: a Meta-Analysis and Diagnostic Test Accuracy Review. *Pathol Oncol Res* [Epub ahead of print]
31. Ritz, O., Guiter, C., Dorsch, K., Dusanter-Fourt, I., Wegener, S., Jouault, H., Gaulard, P., Castellano, F., Möller, P., Leroy, K. (2008). STAT6 activity is regulated by SOCS-1 and modulates BCL-XL expression in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia*, 22, 2106-2110.
32. Rubinstein, J. C., Sznol, M., Pavlick, A. C., Ariyan, S., Cheng, E., Bacchiocchi, A., Kluger, H.M., Narayan, D., Halaban, R. (2010). Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *Journal of translational medicine* [electronic resource], 8, 67.
33. Safaee Ardekani, G., Jafarnejad, S. M., Tan, L., Saeedi, A., Li, G. (2012). The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Public Library of Science one* [electronic resource], 7, e47054.
34. Sahm, F., Capper, D., Preusser, M., Meyer, J., Stenzinger, A., Lasitschka, F., Berghoff, A.S., Habel, A., Schneider, M., Kulozik, A., Anagnostopoulos, I., Müllauer, L., Mechttersheimer, G., von Deimling, A. (2012). BRAFV600E mutant protein is expressed in cells of variable maturation in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*, 120, e28-34.

35. Salama, A. K., Flaherty, K. T. (2013). BRAF in melanoma: current strategies and future directions. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19, 4326-4334.
36. Shrout, P. E. & Fleiss, J. L. (1979). Intraclass correlation: Uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*, 86, 420-428.
37. Sinicrope, F. A., Smyrk, T. C., Tougeron, D., Thibodeau, S. N., Singh, S., Muranyi, A., Shanmugam, K., Grogan, T.M., Alberts, S.R., Shi, Q. (2013). Mutation-specific antibody detects mutant BRAFV600E protein expression in human colon carcinomas. *Cancer*, 119, 2765-2770.
38. Sosman, J. A., Kim, K. B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A. C., Weber, J. S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Hersey, P., Kefford, R., Lawrence, D., Puzanov, I., Lewis, K.D., Amaravadi, R.K., Chmielowski, B., Lawrence, H.J., Shyr, Y., Ye, F., Li, J., Nolop, K.B., Lee, R.J., Joe, A.K. Ribas, A. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *The New England journal of medicine*, 366, 707-714.
39. Sperveslage, J., Gierke, M., Capper, D., Honegger, J., Sipos, B., Beschorner, R., Schittenhelm, J. (2013). VE1 immunohistochemistry in pituitary adenomas is not associated with BRAF V600E mutation. *Acta neuropathologica*, 125, 911-912.
40. Teng, H. W., Huang, Y. C., Lin, J. K., Chen, W. S., Lin, T. C., Jiang, J. K., Yen, C.C., Li, A.F., Wang, H.W., Chang, S.C., Lan, Y.T., Lin, C.C., Wang, H.S., Yang, S. H. (2012). BRAF mutation is a prognostic biomarker for colorectal liver metastasectomy. *Journal of surgical oncology*, 106, 123-129.
41. Tiacci, E., Trifonov, V., Schiavoni, G., Holmes, A., Kern, W., Martelli, M. P., Pucciarini, A., Bigerna, B., Pacini, R., Wells, V.A., Sportoletti, P., Pettrossi, V., Mannucci, R., Elliott, O., Liso, A., Ambrosetti, A., Pulsoni, A., Forconi, F., Trentin, L.,

- Semenzato, G., Inghirami, G., Capponi, M., Di Raimondo, F., Patti, C., Arcaini, L., Musto, P., Pileri, S., Haferlach, C., Schnittger, S., Pizzolo, G., Foà, R., Fari-nelli, L., Haferlach, T., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Falini, B. (2011). BRAF mu-tations in hairy-cell leukemia. The New England journal of medicine, 364, 2305-2315.
42. Tiacci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A, Scott S, Zaja F, Devlin S, Pulsoni A, Chung YR, Cimminiello M, Kim E, Rossi D, Stone RM, Motta G, Saven A, Varettoni M, Altman JK, Anastasia A, Grever MR, Ambrosetti A, Rai KR, Frati-celli V, Lacouture ME, Carella AM, Levine RL, Leoni P, Rambaldi A, Falzetti F, Ascani S, Capponi M, Martelli MP, Park CY, Pileri SA, Rosen N, Foà R, Berger MF, Zinzani PL, Abdel-Wahab O, Falini B, Tallman MS (2015). Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. N Engl J Med. 373:1733-47
43. Wong, K. K. (2009). Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/ MEK/ERK pathway. Recent patents on anti-cancer drug discovery, 4, 28-35.
44. Ziai, J., Hui, P. (2012). BRAF mutation testing in clinical practice. Expert review of molecular diagnostics, 12, 127-138.

Herstellerangaben:

45. Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, Code K5005, 4th edition/ 4ème édition/ 4. Ausgabe
46. Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rab-bit/Mouse, Code K5007, 3rd edition/ 3ème édition/ 3. Auflage

Links:

47. Inter assay agreement Tool Kit der Chinese University of Hongkong <http://department.obg.cuhk.edu.hk/researchsupport/statmenu.asp> (16.05.2016)
48. Tafinlar® (Dabrafenib) Informationen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/201401-Tafinlar.pdf> (28.05.2016)
49. Zelboraf® (Vemurafenib) Informationen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/2012034-Zelboraf.pdf> (28.05.2016)

Anhang

Tabelle 5. Testperformancekennwerte für die manuelle Immunhistochemie (IHC) inklusive nicht erkannter BRAF V600K Mutationen

Manuelle IHC	V600E mutiert	Wildtyp
Immunopositiv	20	0
Immunonegativ	3	10
	Sensitivität: 20/23=86,96%	Spezifität: 10/10=100%

Tabelle 6. Testperformancekennwerte für die automatisierte Immunhistochemie (IHC) inklusive nicht erkannter BRAF V600K Mutationen

Automatisierte IHC	V600E mutiert	Wildtyp
Immunopositiv	18	0
Immunonegativ	3	10
	Sensitivität: 18/21=85,71%	Spezifität: 10/10=100%

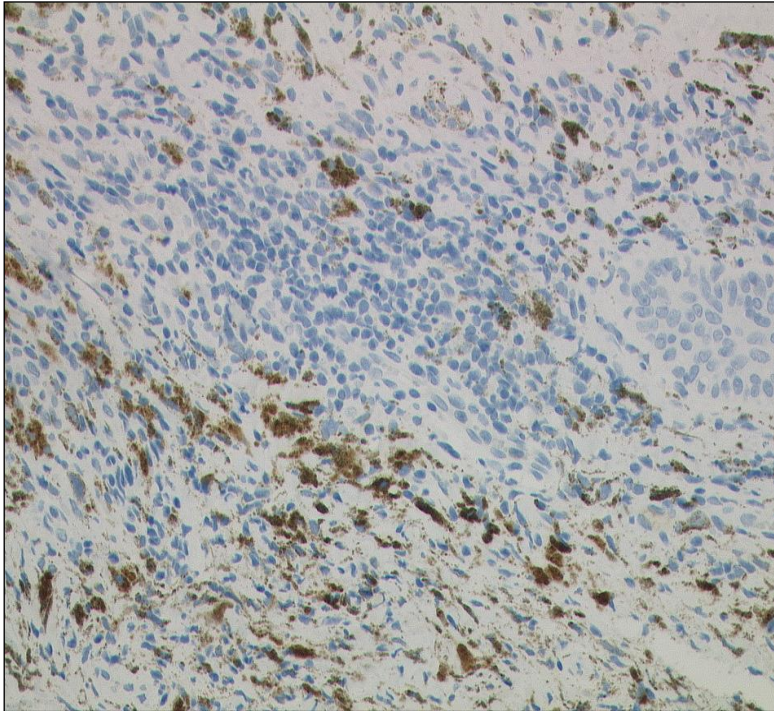


Abbildung 4. Malignes Melanom (Melanin produzierend, 10x Vergrößerung), Idealbild einer negativen Färbung

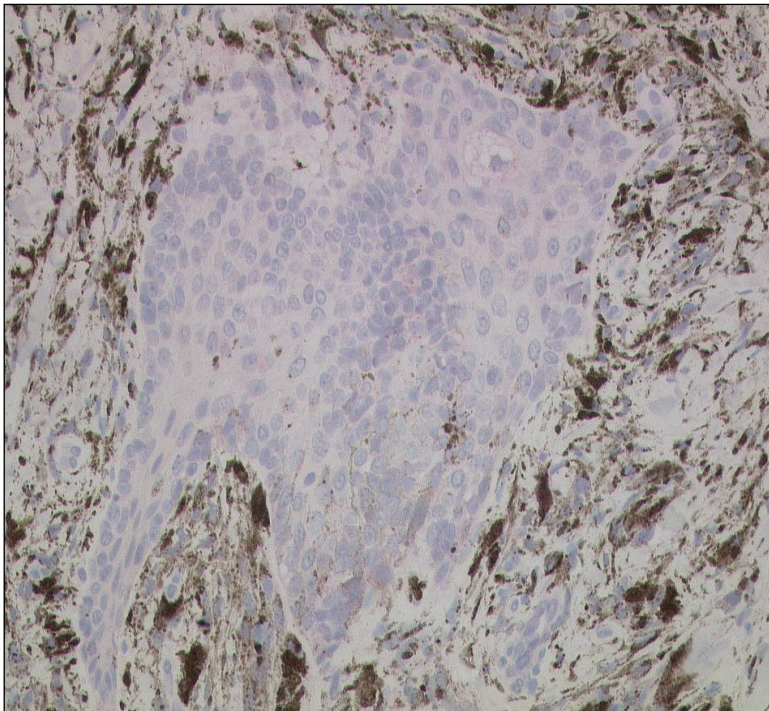


Abbildung 5. Malignes Melanom (Melanin produzierend, 10x Vergrößerung), schwach positive, streng zytoplasmatische Färbung

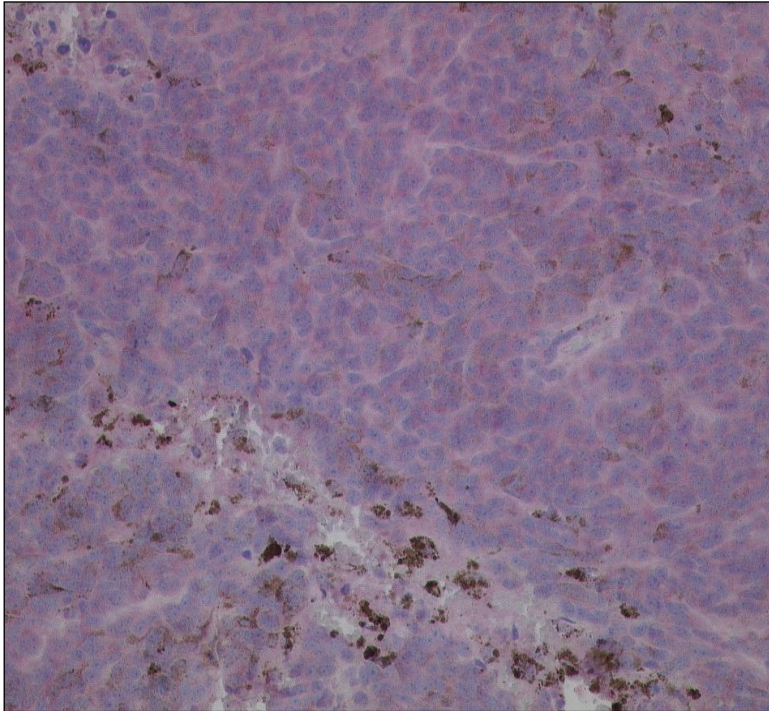


Abbildung 6A. Malignes Melanom (Melanin produzierend, 10x Vergrößerung) mäßige, streng zytoplasmatische Färbung

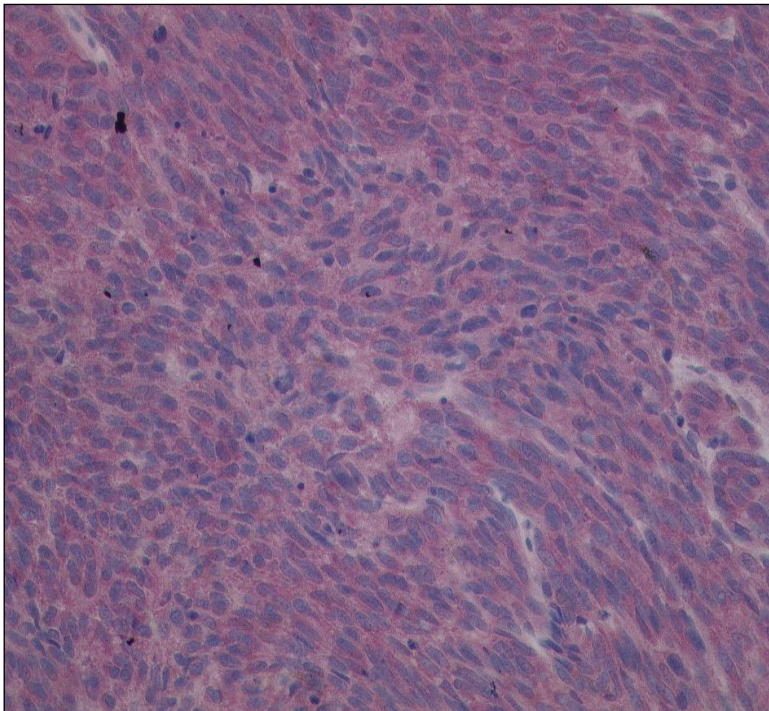


Abbildung 6B. Malignes Melanom (ohne Melanin, 10x Vergrößerung) mäßige, homogen zytoplasmatische Färbung

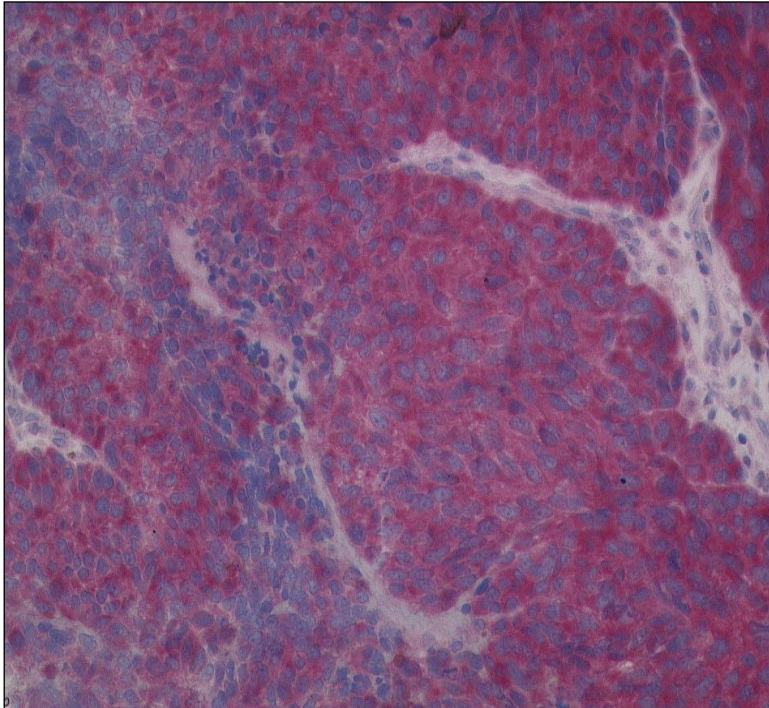


Abbildung 7A. Malignes Melanom (ohne Melanin, 10x Vergrößerung) starke, streng zytoplasmatische Färbung

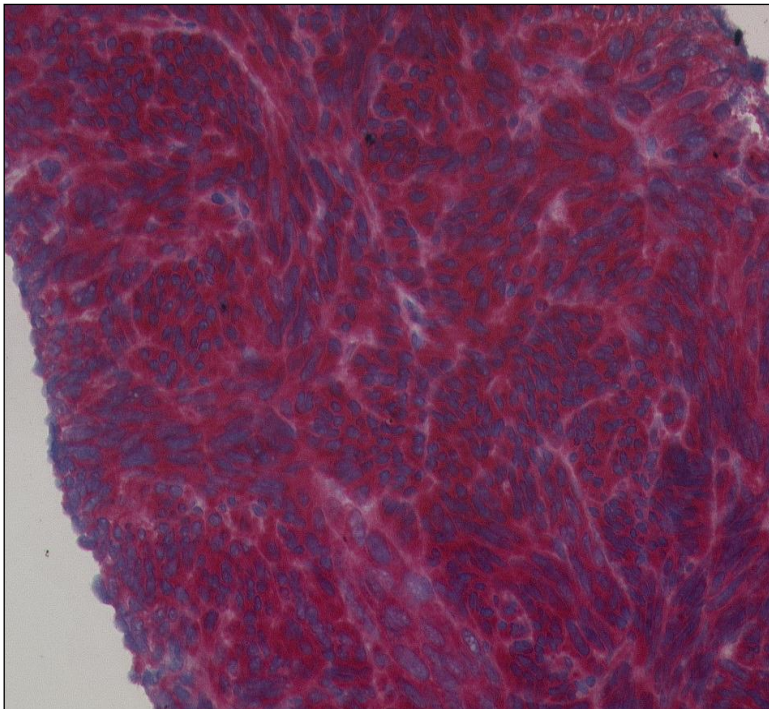


Abbildung 7B. Malignes Melanom (ohne Melanin, 10x Vergrößerung) starke, streng zytoplasmatische Färbung

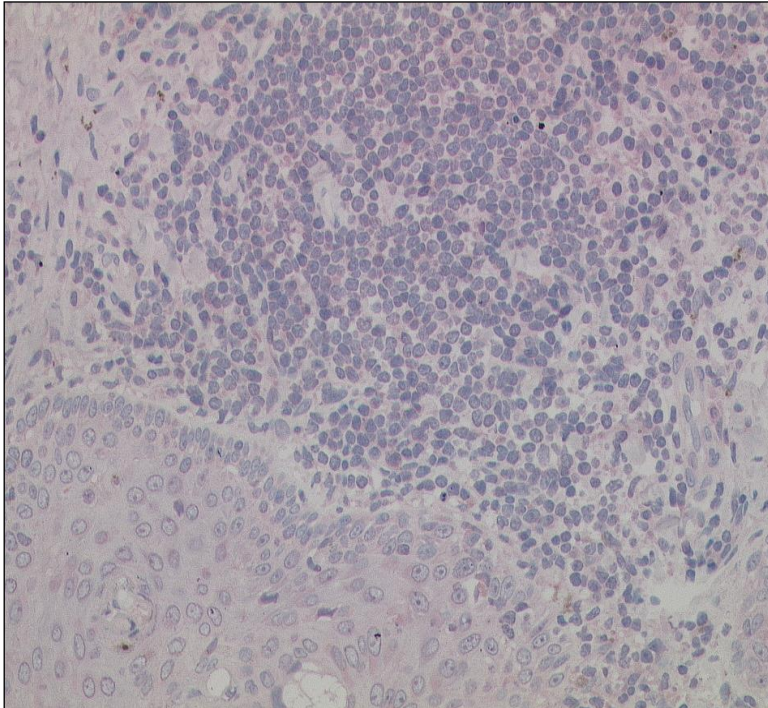


Abbildung 8A. Falsch Positive Färbung Malignes Melanom (ohne Melanin, 10x Vergrößerung) schwache Färbung mit Hintergrundfärbung (schlecht differenziert)

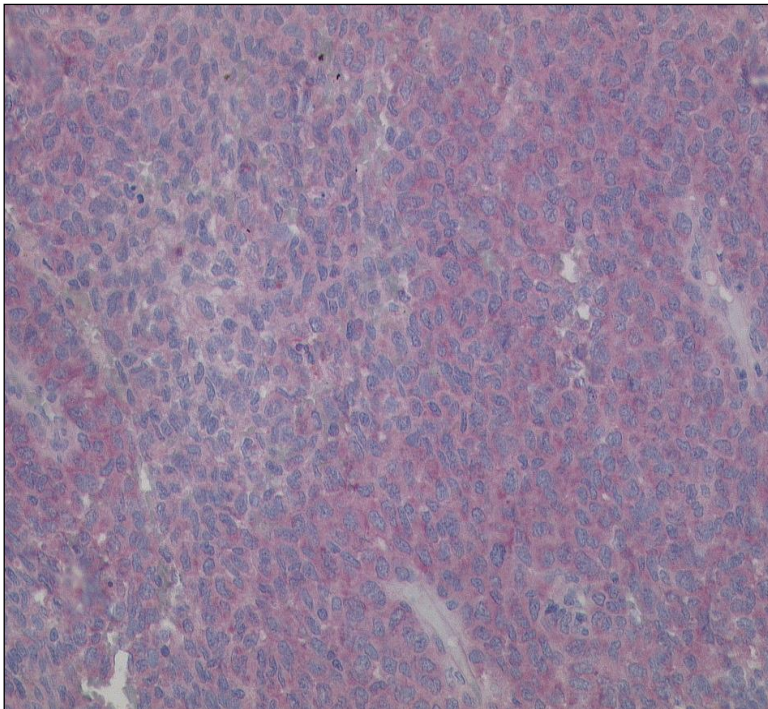


Abbildung 8B. Falsch Positive Färbung Malignes Melanom (ohne Melanin, 10x Vergrößerung) mäßige, diffus zytoplasmatische Färbung (schlecht differenziert)

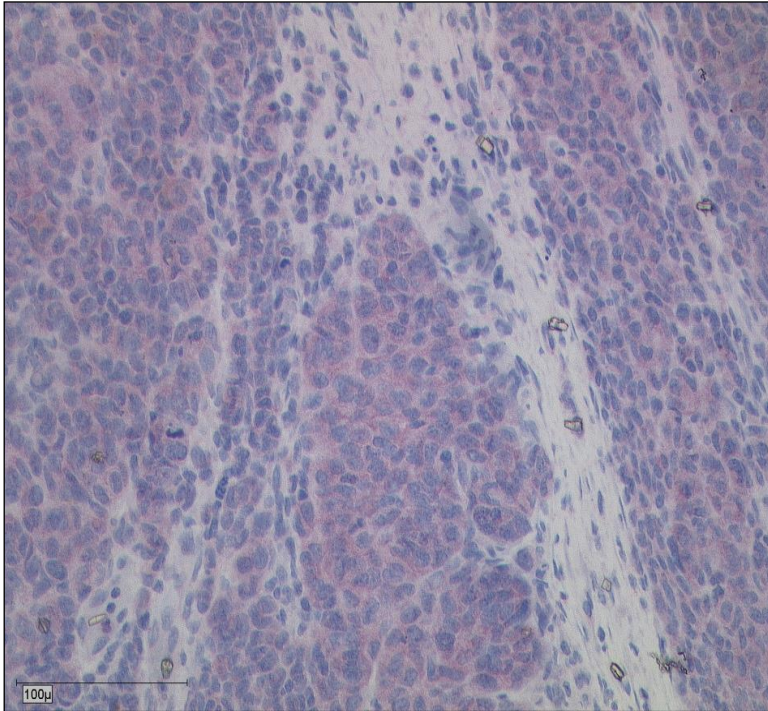


Abbildung 8C Falsch Positive Färbung Malignes Melanom (ohne Melanin, 10x Vergrößerung) mäßige, streng zytoplasmatische Färbung

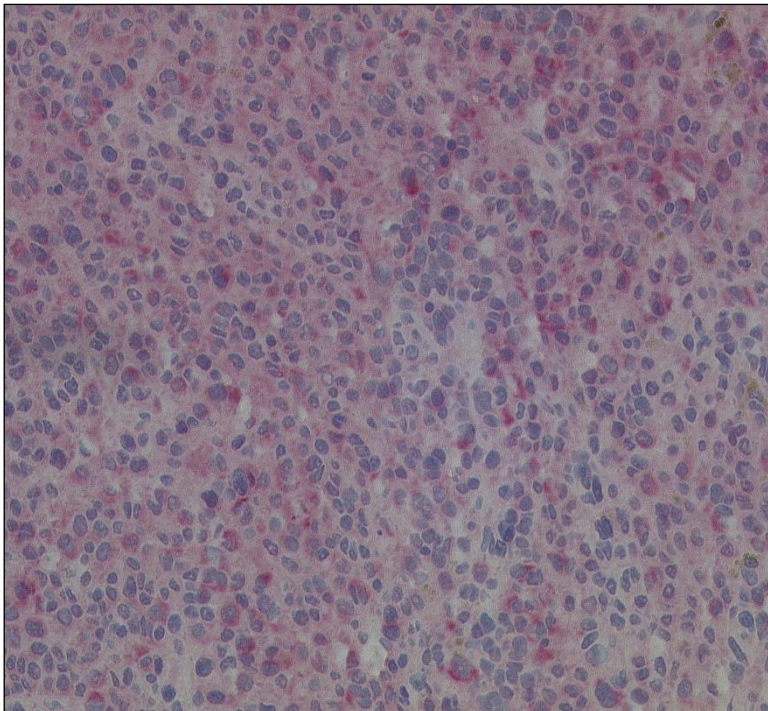


Abbildung 8D Falsch Positive Färbung Malignes Melanom (ohne Melanin, 10x Vergrößerung) mäßige, diffuse-körnige, zytoplasmatische Färbung

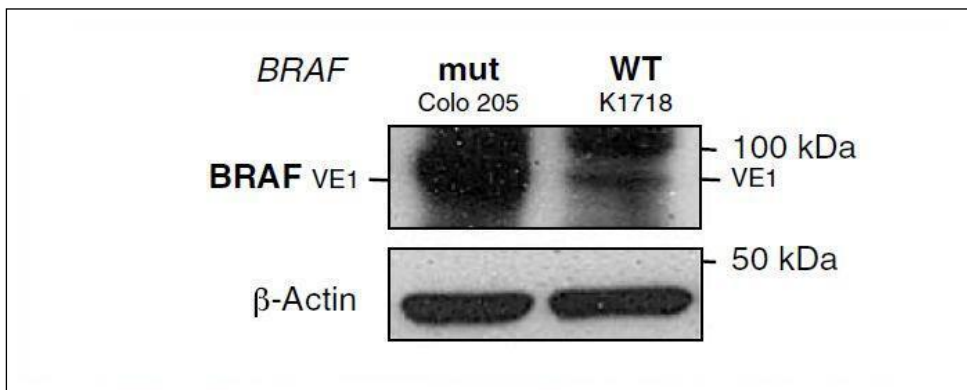


Abbildung 9. Western Blot mit dem BRAF-V600E mutationsspezifischen (VE1) Antikörper. (auch erschienen in Dinges et al. 2015)

Man erkennt eine dicke Bande bei 95 kDa im Colo 205 Lysat, und eine sehr dünne Bande bei 95 kDa im K1718 Lysat. Die Bande der Ladekontrolle mit Actin ist in beiden Fällen gleich dick

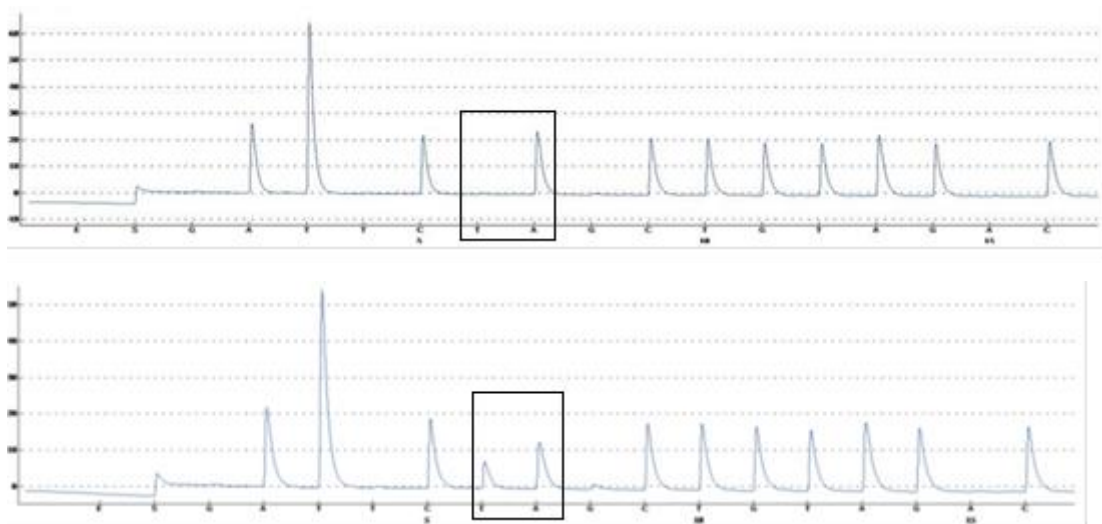


Abbildung 10. Pyrogramme, von links nach rechts wurden die Lichtemissionen bei Nukleotidzugabe gemessen. Bei 5 (eine Spitze vor dem Kasten) fängt die reverse Transkription von Codon 600 an, auf Cytosin (erste Spitze) folgt normalerweise Adenin und wieder Cytosin. Oben: normale Abfolge, Unten: Nach Cytosin- gibt es bei Thyminzugabe eine Lichtemission, die halb so hoch ist wie die Emission danach bei Adeninzugabe. Es liegen 2 unterschiedliche Arten von DNA in der Probe vor. 33% sind V600E mutiert, 66% sind Wildtyp DNA. Danach ist der Code wieder einheitlich.

Urheberrechtserklärung

Einige der Grafiken, die in dieser Arbeit abgebildet sind, sind in ähnlicher Form bereits in der Publikation „Validation of a Manual Protocol for BRAF V600E Mutation-specific Immunohistochemistry.“ (Dinges et al. 2015, PubMed ID 25611237) erschienen und zwar in der Zeitschrift „AIMM – Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology“ (Mai/Juni 2015 - Volume 23 - Issue 5 - p 382–388). Die Urheberrechte durch die Veröffentlichung an den herausgebenden Verlag Wolters Kluwer abgegeben. Nach Rücksprache mit Wolters Kluwer wurde mir persönlich versichert, dass die genannten Grafiken und Daten im Rahmen einer Promotion bzw. Dissertation vom Autor der Publikation verwendet werden dürfen. Dies geht auch aus dem Bestellformular für die Verwendung von urheberrechtlich geschütztem Material des Verlages hervor.

Link: http://journals.lww.com/appliedimmunohist/Abstract/2015/05000/Validation_of_a_Manual_Protocol_for_BRAF_V600E.9.aspx

(Stand: 30.05.2016)

Es liegen somit ausdrücklich keine Verletzungen von Urheberrechten vor.

Veröffentlichung:

Dinges, H. C., D. Capper, O. Ritz, S. Brüderlein, R. Marienfeld, A. von Deimling, P. Möller, J. K. Lennerz (2015). Validation of a Manual Protocol for BRAF V600E Mutation-specific Immunohistochemistry; Appl Immunohistochem Mol Morphol 23(5): 382-388. DOI Number: 10.1097/PAI.0000000000000092

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Peter Möller, welcher das Institut für Pathologie der Universität Ulm leitet, Dank sagen. Er gab mir die Gelegenheit in seinem Institut einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten zu bekommen und meine Doktorarbeit anzufertigen und hat mich die gesamte Zeit über dabei unterstützt.

Als nächstes möchte ich meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. med. Jochen Lennerz für seine engagierte und exzellente Unterstützung danken. Seine präzise, analytische Art Probleme zu lösen hat mich von Beginn an fasziniert und motiviert und wird mir ein Vorbild bleiben.

Außerdem möchte ich den Mitarbeitern am Institut für Pathologie danken, die ihre Erfahrungen und technischen Kenntnisse bereitwillig mit mir geteilt haben und so einen großen Beitrag zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Besonders hervorheben möchte ich hier Frau Dr. Silke Brüderlein, Michaela Buck, Karola Dorsch, Lena Kelsch, Julia Kiedaisch, Dr. Ulrike Kostezka, Prof. Ralf Marienfeld, Elena Mosser, und Iwona Nerbas.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Olga Ritz für die Durchführung und Bereitstellung des Western Blots.

Und natürlich bin ich dem Institut für Neuropathologie der Universität Heidelberg sehr dankbar, welches sich freundlicherweise bereiterklärt hat die übersendeten Proben der Studienkohorte mit dem Ventana BenchMark XT zu färben. Namentlich erwähnen möchte ich hier den Direktor Prof. Andreas von Deimling und Dr. David Capper.

Und natürlich werde ich immer meinen Eltern und meiner Familie dankbar sein, nicht nur für die Unterstützung über den Zeitraum dieser Doktorarbeit, sondern für die Geduld, Arbeit und Mühe, welche sie in meine Ausbildung und mein Wohlergehen

mein ganzes Leben über investiert haben. Für die nächste Generation will ich es ihnen einmal gleichtun.

Curriculum vitae

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.