

**Universitätsklinikum Ulm
Institut für Pathologie**

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

**Potentielle klinische Implikationen von *BRAF* Mutationen in histiozytären
Proliferationen**

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

**Anna-Maria Bubolz
geboren in Gehrden**

2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Wirth

- 1. Berichterstatter: PD Dr. Lennerz**
- 2. Berichterstatter: PD Dr. Viardot**

Tag der Promotion: 27.04.2017

Für meine Großeltern

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

Bubolz AM, Weissinger SE, Stenzinger A, Arndt A, Steinestel K, Brüderlein S, Cario H, Lubatschowski A, Welke C, Anagnostopoulos I, Barth TF, Beer AJ, Möller P, Gottstein M, Viardot A, Lennerz JK: Potential clinical implications of BRAF mutations in histiocytic proliferations. *Oncotarget* 5:4060-4070 (2014)

Der Eigenanteil der Autorin wird im Abschnitt „2.2 Methoden“ genau angegeben. Zusätzlich sind die „Authorship Contributions“ der Publikation zu beachten, in welchen die Leistung der Autorin spezifiziert wird. Die Autorin wurde zu jedem Zeitpunkt der Forschungsarbeit und des Verfassens von Publikation und Dissertation sowie dem Erstellen der Abbildungen in jeglicher Hinsicht von ihrem Betreuer Herrn PD Lennerz unterstützt. Ergebnisse, welche nicht aus der Arbeit der Autorin stammen, werden in dieser Dissertation nicht aufgeführt. Die Diskussion bezieht auch die Publikation mit ein, konzentriert sich jedoch auf die Ergebnisse der Autorin. Abschnitte bzw. Abbildungen welche aus der Publikation stammen wurden mit der Quellenangabe kenntlich gemacht.

Hinsichtlich des Copyrights teilte „Oncotarget“ der Autorin folgendes mit:

“Oncotarget applies the Creative Commons Attribution License (CCAL) to all works we publish (read the human-readable summary or the full license legal code). Under the CCAL, authors retain ownership of the copyright for their article, but authors allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles in Oncotarget journal, so long as the original authors and source are cited.

No permission is required from the authors or the publishers”.

Creative Commons Attribution 3.0 License (CC BY 3.0.)

<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Oncotarget verwendet die "Creative Commons Attribution License" (CCAL) in allen publizierten Arbeiten (nachzulesen in „the human-readable summary“ bzw. "the full license legal code"). Unter der CCAL behalten die Autoren jegliche Rechte bezüglich des Copyrights ihrer Arbeit, erlauben jedoch jedem den Download, die Verwendung, das Drucken, das Modifizieren, das Verbreiten und/oder das Kopieren der Arbeiten aus Oncotarget, solange die Originalautoren und Quelle angegeben werden. Eine Erlaubnis der Autoren oder der Verleger ist nicht nötig.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	III
1. Einleitung	1
1.1 Histiozyten	1
1.2 Histiozytäre Erkrankungen	2
1.3 <i>BRAF</i> Mutationen	5
1.4 <i>BRAF</i> Mutationen in der Langerhans-Zell-Histiozytose	6
1.5 <i>BRAF</i> Inhibitoren	6
1.6 Fragestellung	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Materialien	9
2.2 Methoden	12
2.2.1 Studienkohorte	12
2.2.2 Mikrodisektion und DNA Extraktion	14
2.2.3 Molekulargenetische Analyse	17
2.2.4 Sequenzierung	20
2.2.5 Auswertung	22
2.2.6 Statistische Analyse	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Metaanalyse der <i>BRAF</i> Mutationsfrequenzen bei LCH	26
3.2 Genotypisierung	27

3.2.1 Mutationsfrequenz nach Entitäten	27
3.2.2 Mutationsanalysen in der Gruppe der Langerhans-Zell-Histiozytose	28
3.3 Patientenauswahl für eine BRAF Inhibitor Therapie	33
4. Diskussion	34
4.1 Methoden der Mutationsanalyse	34
4.2 <i>BRAF</i> Mutationen in Non-Langerhans-Zell-Histiozytosen	36
4.3 <i>BRAF</i> Mutationen in Langerhans-Zell-Histiozytosen	37
4.4 Die BRAF-Inhibitor Therapie als neuartige Behandlungsoption	40
4.5 Schlussfolgerung	41
5. Zusammenfassung	42
6. Literaturverzeichnis	43
Danksagung	59
Curriculum vitae	60

Abkürzungen

°C	Grad Celcius
µl	microliter
µm	micrometer
Abb.	Abbildung
A	Adenin, DNA Base
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, wird bei Stress jeglicher Art ausgeschüttet
<i>ARAF</i>	Gen, Isoform von RAF
ATP	Adenosintriphosphat
B	<i>Bone</i> , Knochenbeteiligung
<i>BRAF</i>	Gen, <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BRAF	BRAF Protein, Serin/Threonin-Protein Kinase BRAF
BS	<i>Bone and Skin</i> , Knochen- und Hautbeteiligung
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin, DNA-Base
CCCU	<i>Comprehensive Cancer Center Ulm (engl.)</i>
CCD Sensor	<i>charge-coupled device (engl.)</i> , lichtempfindliches elektronisches Bauelement
CD1a	<i>Cluster of Differentiation 1a Protein (engl.)</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4 Protein (engl.)</i>
CD34	<i>Cluster of Differentiation 34 Protein (engl.)</i>
CD68	<i>Cluster of Differentiation 68 Protein (engl.)</i>
CR	<i>Complete Remission</i> , komplette Remission
DC	Dendritische Zelle
DCS	Sarkom der dendritischen Zellen
d.h.	das heißt

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EM	Elektronenmikroskop
ERK	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase (engl.)</i> , Serin/Threonin-Kinase
et al.	et alii, et aliae, et alia
evtl.	eventuell
FDG-PET	Fluordesoxyglucose- Positronen-Emissions-Tomographie
FFPE	Formalin-Fixiert, Paraffin Eingebettet
g	Gramm
G	Guanin, DNA-Base
Ge	Beteiligung des Genitals
GCT	Granularzelltumor
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (engl.)</i> , bewirkt die Differenzierung aus Vorläuferzellen zu Makrophagen und Granulozyten
GTP	Guanosintriphosphat
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen der Klasse II
ICD-0-3	Internationale Klassifizierung onkologischer Erkrankungen, dritte Version (2000)
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, Version 10 (2012)
Interdigit. DC	Interdigitierende dendritische Zelle
Ki67	Protein, Proliferationsmarker
JXG	Juveniles Xanthogranulom
L	Lungenbeteiligung
LCH	Langerhans-Zell-Histiozytose
LK	Lymphknoten

M	Morbus
mA	Miliampere
MAP2K1	<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 gene</i>
MAP	<i>Mitogene-activated Protein</i>
MAP/ERK Signalweg	Signalweg, welcher unter anderem Zellteilung bewirkt
M-PIRE	Retikuloendotheliales bzw. mononukleäres Phagozytensystem
mut	Mutiert
n	Fallzahl
nm	nanometer
No	Fallzahl pro Charakteristik
No. mut.	Anzahl mutierter Fälle
Nr.	Nummer
NSE	neuronenspezifische Enolase, Neuronenspezifisches Enzym
<i>P</i>	<i>P</i> -Wert
Pat. ID	Patienten-Identifikationsnummer
Peak	<i>Gipfel (engl)</i> , hier: Höhe des Signals der Pyrosequenzierung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	<i>Progressive Disease</i> , progressive Erkrankung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie- Computertomographie
PPi	Pyrophosphat
PR	Partielle Remission
RAF	Proto-Oncogene (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
RAS	' <i>Rat Sarcoma</i> ' GTPase

RAS/RAF Signalweg	Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg, siehe MAP/ERK Signalweg
RDD	Rosai Dorfman Erkrankung
RECIST	Kriterien für die Bewertung des Ansprechens der Behandlung bei soliden Tumoren
ROI	Region von Interesse
rpm	Rotationen pro Minute
S	<i>Skin</i> , Hautbeteiligung
S100	S100 Protein
SD	Stabile Erkrankung
ST	<i>Soft Tissue</i> , Weichteilbeteiligung
SUV	Standardisierter Aufnahmewert
T	Thymin, DNA-Base
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAQ Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α , Zytokin des Immunsystems
TVIPS	<i>Tietz Video and Image Processing Systems (engl.)</i>
USA	<i>United States of America</i>
V	Viszerale Beteiligung
V600E	<i>BRAF</i> c.1799T>A (V600E), häufigste <i>BRAF</i> Mutation, Folge: Substitution eines Valins mit Glutamat
V600D	<i>BRAF</i> c.1799_1800delTGinsAT (V600D), Folge: Substitution eines Valins durch Asparaginsäure
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
Z	Beteiligung der Zunge

1. Einleitung

1.1 Histiozyten

Der Begriff „Histiozyt“ ist historisch geprägt und für heutige Verhältnisse nicht mehr genau genug, da eine Vielzahl von Zellen zusammengefasst werden, welche nach gegenwärtigem Kenntnisstand unterschiedliche Aufgaben im Körper übernehmen.

Ursprünglich wurde hiermit eine Zelle bezeichnet, welche typische Charakteristika wie reichlich Zytoplasma mit kleinen Granula und einem blassen Kern aufwies und in Lymphknoten oder der Milz zu finden war (Wiseman, 1934). Später wurde der Begriff um Zellen erweitert, welche bereits vollständig differenziert waren und aus der Linie der Makrophagen stammten und somit in einer Vielzahl von Organen, einschließlich der Leber und Lunge, zu finden waren (Cline, 1975). Ergänzend hinzugezählt wurden dendritische Zellen, sowie Langerhans Zellen der Haut, sodass der Begriff „Histiozyt“ heutzutage Zellen beider Zelllinien umfasst, welche zusammenfassend als retikulohistiozytäres bzw. mononukleäres Phagozytensystem (M-PIRE) bezeichnet werden (Abb. 2).

Die primäre Aufgabe dieser Zellen besteht darin, bestimmte Antigene zu eliminieren bzw. zu präsentieren. Die unreifen myeloiden Zellen zirkulieren nach Stimulation mit GM-CFS im Blut, die endgültige Differenzierung findet in der Folge statt. Die eine Linie wird zu Makrophagen, welche Antigene phagozytieren und diese somit unschädlich machen. Andererseits entstehen die Langerhans-Zellen, welche in der Dermis im Stratum spinosum liegen und mit Antigenkontakt zu reifen dendritischen Zellen werden, welche das Antigen wiederum CD4⁺ T-Lymphozyten präsentieren (Cline, 1994; Swerdlow et al., 2008a). Ein typisches Charakteristikum von Langerhans-Zellen sind sowohl Birbeck-Granula (Abb.1), welche auch als pathognomonisch für die Langerhans-Zell-Histiozytose gelten, wie auch ein positives

immunhistochemisches Färbeverhalten für Langerin (Cline, 1994; Lau et al., 2008; Chikwava und Jaffe, 2004).

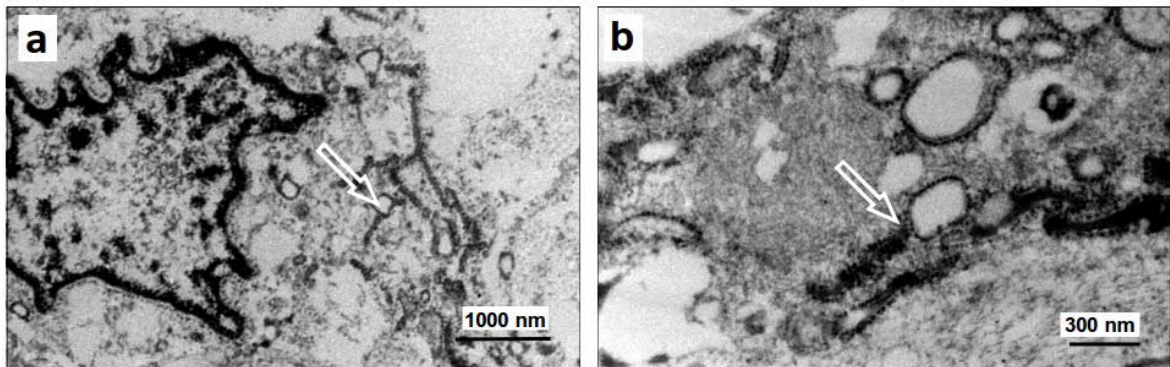
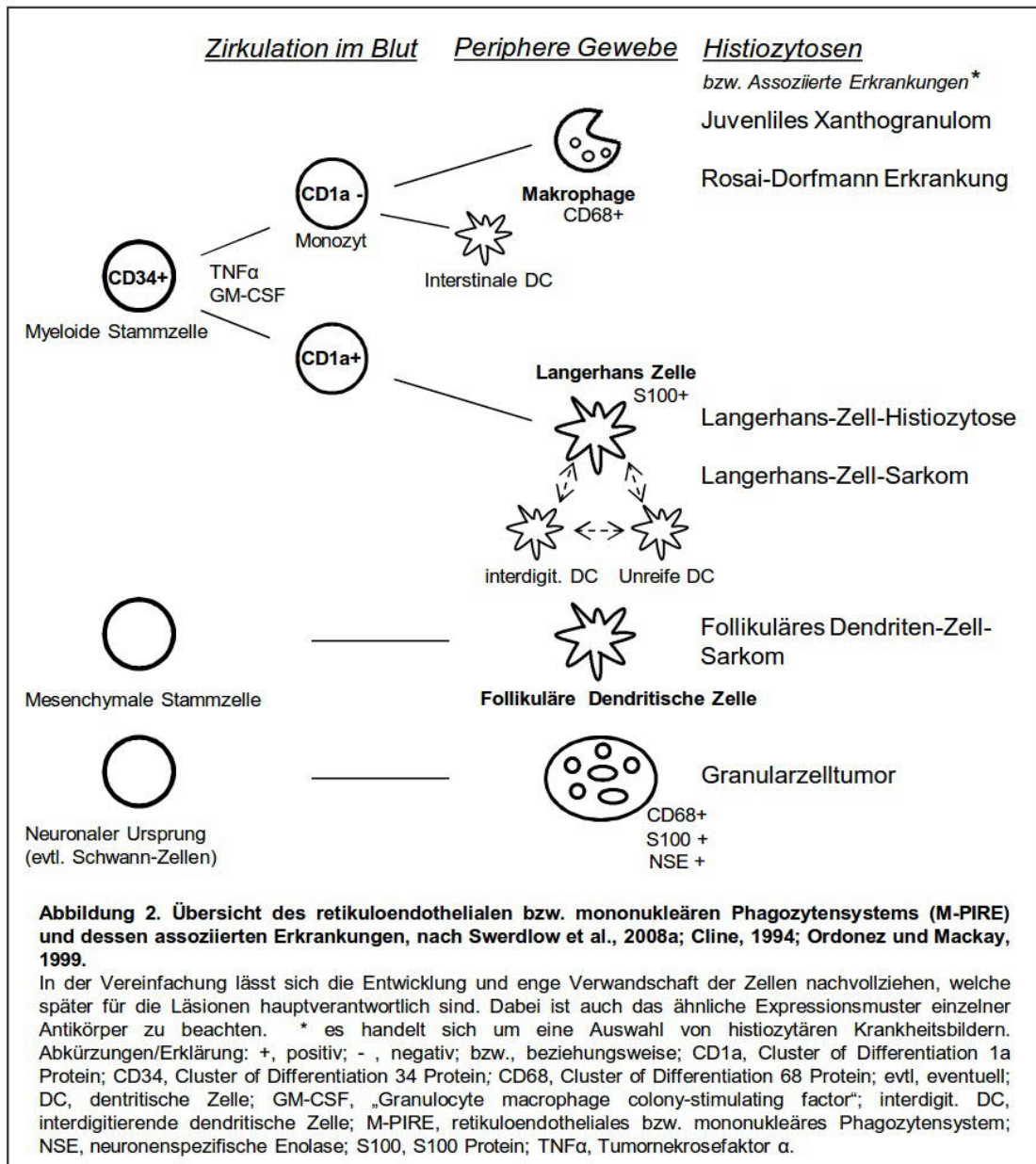


Abbildung 1: Birbeck-Granula im Elektronenmikroskop als pathognomonischer Marker von Langerhans-Zellen, nach Bubolz et al., 2014.

a: Die ultrastrukturelle Untersuchung des histiozytären Infiltrats zeigt die gelappten Kerne der Tennisschläger-förmigen zytoplasmatischen Birbeck-Granula mit offener Chromatinstruktur und Mangel an prominenten Nukleolen (Pfeil). **b:** Die ultrahohe Vergrößerung der Birbeck-Granula zeigt die stabförmigen, elektronendichten Konfigurationen und vakuolisierten Blasen welche für die LCH diagnostisch sind (Pfeil). *Abkürzungen:* LCH, Langerhans-Zell-Histiozytose; nm, nanometer.

1.2 Histiozytäre Erkrankungen

Histiozytäre Tumore stammen aus dem M-PIRE (Isaacson et al., 1982; Orfanos und Lämmer, 1980; Pileri et al., 2002). Die klinischen Symptome der verschiedenen Krankheitsentitäten sind sehr variabel und reichen von gutartigen, lokalisierten Läsionen mit lokalen histiozytären Infiltraten, beispielsweise des Markraums von Knochen, zu sehr aggressiven systemischen Erkrankungen mit Multiorganinvasion und unbehandelt hoher Mortalität (Nezelof und Basset, 1998). Diagnostisch wird zwischen zwei Läsionen unterschieden: die eine Gruppe trägt die Oberflächenmarker von Langerhans-Zellen, hierzu gehört neben der Langerhans-Zell-Histiozytose („Langerhans Cell Histiocytosis“, LCH) auch das Langerhans-Zell-Sarkom. Die zweite Gruppe bilden die Non-Langerhans-Zell-Histiozytosen, welche die Oberflächenmarker der histiozytären oder dendritischen Zelllinie tragen (Chu et al., 1987; Pileri et al., 2002) und welche aus verschiedenen Krankheitsbildern zusammengesetzt werden (nach Bubolz et al., 2014).



1.2.1 Langerhans-Zell-Histiozytose

Die Langerhans-Zell-Histiozytose wird durch eine Ansammlung von Langerhans-Zellen definiert, welche in Kombination mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten Granulome bilden (Ben-Ezra et al., 1991).

Der Name Langerhans-Zell-Histiozytose ist durch die immunhistochemischen Färbemuster der prädominierenden Zellen, welche positiv für Langerin sind, bedingt (Lau et al., 2008). Die Genese der LCH war lange Zeit unklar, insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Verlaufsformen sowie des inflammatorischen Charakters der Erkrankung. In jüngster Zeit wird, insbesondere aufgrund des Nachweises von spezifischen Mutationen, von einer Klonalität der malignen Zellen ausgegangen und die Erkrankung als neoplastisch angesehen (Berres et al., 2015; Kamionek et al., 2016). Außerdem sprechen neuere Studien gegen den Ursprung der Erkrankung aus reifen Langerhans-Zellen, sondern sehen diesen in einer missgeleiteten Differenzierung unreifer dendritischer Zellen (Berres et al., 2015). Im Gegensatz zu regelhaften Langerhans-Zellen, welche in der Haut vorkommen, kann nahezu jede Körperregion von den pathologischen Zellen infiltriert werden.

Unter die Sammelbezeichnung „Langerhans-Zell-Histiozytose“ fallen drei Hauptausprägungen: Erstens das Eosinophile Granulom, mit einem lokalen Befall eines Organsystems. Die häufigste Lokalisation stellen hier Knochen und die Haut dar (Swerdlow et al., 2008b) und das Erscheinungsbild reicht von asymptomatischen Knochenläsionen bis zu generalisierter Hautbeteiligung.

Zweitens das Hand-Schüller-Christian-Syndrom mit mehreren Herden im gleichen Organsystem und typischer Trias aus Exophthalmus, Knochenbefall und Diabetes insipidus. Drittens das Letterer Siwe Syndrom, welches mit multiplen Herden in unterschiedlichsten Systemen die schwerste Verlaufsform darstellt und unbehandelt meist rasch tödlich verläuft (Nezelof und Basset, 1998; Howarth et al., 1999; Lichtenstein, 1953).

1.2.2 Therapie der Langerhans-Zell-Histiozytose

Derzeitige therapeutische Strategien beruhen, aufgrund des Fehlens von Evidenz aus randomisierten kontrollierten klinischen Studien, auf genauer Histotypisierung sowie Klassifizierung der Krankheiten durch das beteiligte Organsystem (Howarth et al., 1999). Während bei unifokalen, meist benignen, Läsionen eine chirurgische Resektion oder milde Chemotherapie häufig ausreichend ist (Nauert et al., 1983), bestehen bei Patienten mit systemischer Beteiligung Therapieschemata mit Bestrahlung und/oder Chemotherapie und in jüngerer Zeit auch Bestrebungen neue molekulare Ansätze in der Therapie zu berücksichtigen (Janku et al., 2010; Montella et al., 2004; Willis et al., 1996) (nach Bubolz et al., 2014)

1.3 *BRAF* Mutationen

2010 wurden das Auftreten von *BRAF*-Mutationen erstmals für die Langerhans-Zell-Histiozytose beschrieben (Badalian-Very et al., 2010). Das *BRAF* Gen ist auf dem Chromosom 7q34 lokalisiert (Eychène et al., 1992) und codiert für das BRAF Protein, welches aus drei Komponenten besteht: Einem Zinkfingermotiv, einer serinreichen Region und einer katalytischen Kinase-Domäne (Daum et al., 1994; Cutler et al., 1998). In der großen Mehrheit der Fälle resultiert eine Mutation in einer Aktivierung des MAPK/ERK Signalwegs (Wan et al., 2004) welche als onkozytäre Vorläuferläsion wiederum die Aktivierung des RAS/RAF-Wegs bewirkt (Hoeflich et al., 2009; McCubrey et al., 2006; Wong, 2009) und damit zu exzessiver Proliferation führt (Wan et al., 2004). Die verschiedenen *BRAF* Mutationen, davon die häufigste die *BRAF* V600E Mutation, wurden in einer Reihe maligner Erkrankungen nachgewiesen, insbesondere beim malignen Melanom und der Haarzell-Leukämie, aber auch bei Kolonkarzinomen, Glioblastomen oder Sarkomen (Davies et al., 2002; Tiacci et al., 2011). Daneben sind auch Keimbahnmutationen bekannt, welche unter anderem ein Kardio-fazio-kutanes Syndrom auslösen können (Roberts et al., 2006). Von klinischer

Relevanz ist beispielsweise die nahezu hundertprozentige Mutationsrate bei Haarzell-Leukämien (Tiacchi et al., 2011) oder der Nachweis einer *BRAF* Mutation im Kolonkarzinom, da sporadische *BRAF* Mutationen ein Lynch-Syndrom praktisch ausschließen (Palomaki et al., 2009).

1.4 *BRAF* Mutationen in der Langerhans-Zell-Histiozytose

In der ursprünglichen Studie aus dem Jahr 2010 wird das Auftreten von *BRAF*-V600E-Mutationen in 57% der Patienten mit LCH beschrieben und wurde inzwischen von diversen anderen Gruppen bestätigt (Abbildung 5). Der spezifische diagnostische Wert der *BRAF* Mutationen bei LCH ist immer noch nicht vollständig ermittelt und unterliegt weiterhin der momentanen Forschung. Bis jetzt gibt es keine statistischen Belege dafür, dass der *BRAF* Mutationsstatus mit dem betroffenen Organsystem beziehungsweise dem Therapieergebnis korreliert (Badalian-Verly et al., 2010; Haroche et al., 2012; Berres et al., 2014; Alayed et al., 2016) (nach Bubolz et al., 2014).

1.5. *BRAF* Inhibitoren

Bereits seit längerem gibt es eine spezifische Therapiemöglichkeiten für *BRAF* Mutationen in Form einer *BRAF* Inhibition. Während beim malignen Melanom Versuche mit den *BRAF* Inhibitoren der ersten Generation nur mäßige Erfolge erzielt werden konnten (Wellbrock und Hurlstone, 2010), zeigen jüngere Studien mit *BRAF* Inhibitoren der zweiten Generation eine anhaltende Regressionstendenz (Heikal et al., 2011; Larkin et al., 2014). Inzwischen gibt es zahlreiche Beispiele, wie *BRAF* mutierte Tumore erfolgreich mit *BRAF* Inhibitoren behandelt werden (Dietrich et al., 2012; Dao et al., 2015; Protsenko et al., 2015)

1.5.1 BRAF Inhibitoren als Therapie Histiocytyärer Erkrankungen

Obwohl die Therapie mit BRAF Inhibitoren streng genommen einen Off-label Use darstellt, gibt es inzwischen zahlreiche erfolgreiche individuelle Therapieversuche bei Patienten, welche unter einer *BRAF* mutierten histiocytyären Erkrankung leiden. Beispiele sind hier sowohl die Erdheim-Chester Erkrankung, einer Non-LCH, mit enger verwandschaftlicher Beziehung zur LCH, wie auch die Langerhans-Zell-Histiozytose selber (Haroche et al., 2013; Bubolz et al., 2014; Haroche et al., 2015; Gandolfi et al., 2015). In dieser Hinsicht kann bei LCH Patienten, die nicht auf konventionelle Behandlung ansprechen, eine *BRAF*-Mutationsanalyse von Tumorgewebe sinnvoll sein, um eine individuelle Therapieoption mit BRAF Inhibitoren zu evaluieren. Jedoch sollten weitere Studien hinsichtlich Wirksamkeit und Indikation folgen, um mögliche Nebenwirkungen und Langzeitfolgen der zumeist jungen Patienten genauer abschätzen zu können (Aricò, 2016; Abela und Weitzman, 2015).

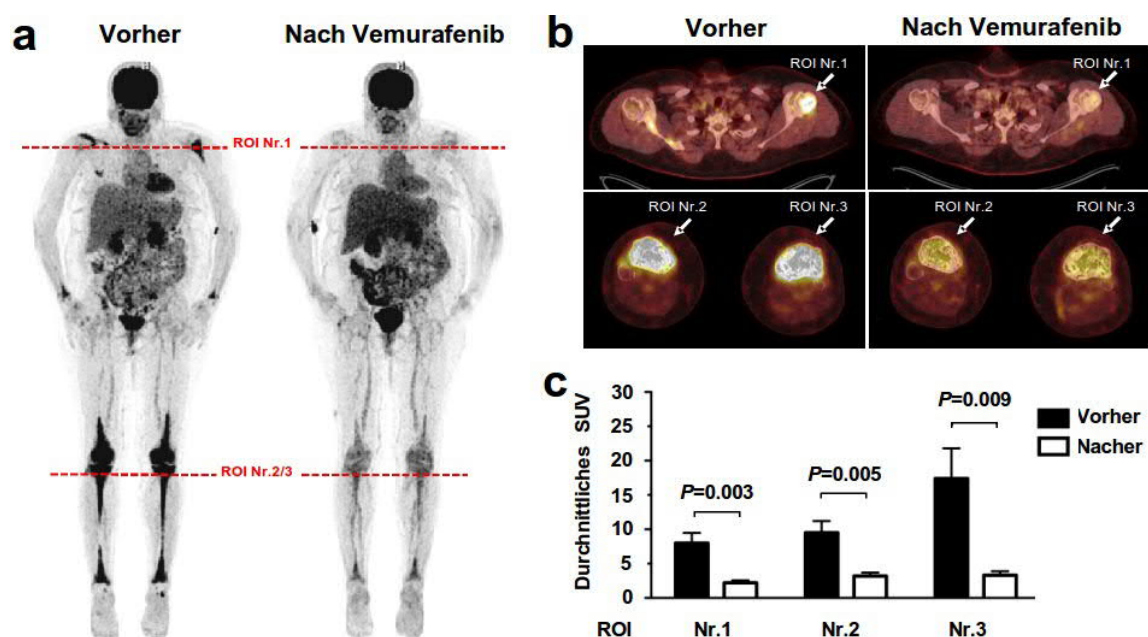


Abbildung 3. Bilder einer *BRAF* mutierten LCH Patientin vor der Behandlung mit BRAF Inhibitoren und sechs Wochen danach, nach Bubolz et al., 2014.

a. FDG-PET Maximum Intensity Projection (MIP) Bilder vor und nach sechs Wochen Behandlung mit Vemurafenib (BRAF Inhibitor) 240 mg/Tag für eine Woche und Vemurafenib 480 mg/Tag für 5 Wochen. Die horizontalen Linien des Ganzkörper-Scans zeigen Querschnitte durch den Oberarmkopf und das Tibiaplateau. **b.** PET-CT-Fusionsbilder des Oberarmkopfes und Tibiaplateaus. Die Pfeile zeigen die Regionen von Interesse (ROI). **c.** Quantitative Vergleiche der mittleren standardisierten Aufnahme-Werte ($\pm$ Standardabweichung); *P*-Werte auf Grundlage des ungepaarten *t*-Tests. Abkürzungen: BRAF, Gen, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; BRAF, BRAF Protein, Serin/Threonin-Protein Kinase BRAF; FDG-PET, Fluoresoxyglucose- Positronen-Emissions-Tomographie; Nr, Nummer; PET-CT, Positronen-Emissions-Tomographie- Computertomographie, SUV, standardisierter Aufnahmewert.

1.6 Fragestellung

Histiozytäre Tumoren sind seltene, häufig benigne Krankheitsbilder. Es gibt jedoch auch schwere, rezidivierende Verläufe, in welchen die Therapieoptionen limitiert sein können.

Ausgehend davon, dass das Vorhandensein der *BRAF* Mutation notwendige Voraussetzung für die Untersuchung einer möglichen klinischen oder therapeutischen Relevanz darstellt, sollte mit der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellung bearbeitet werden:

- Wie ist die Mutationsfrequenz im Spektrum der histiozytären Proliferationen in der Literatur beschrieben?
- Wie verteilen sich die *BRAF* Mutationen in einem deutschen Patientenkollektiv?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und klinischem Erscheinungsbild und/oder Outcome?
- Gibt es eine mögliche Therapierelevanz der Mutation?

Zur Beantwortung wurde eine zweiteilige Studie durchgeführt: a) eine Literaturübersicht und Metaanalyse der *BRAF*-Mutationen bei LCH und b) eine retrospektive Studie mit der Genotypisierung einer Reihe histiozytärer Tumore im Hinblick auf mögliche *BRAF*-Mutationen gefolgt von statistischen Analysen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen dem Genotyp der Läsionen und dem Erscheinungsbild sowie dem Verlauf der Erkrankung.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

100 bp-Leiter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
10x PCR Puffer	Qiagen, Hilden Ulm
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Aqua dest.	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Fluka, München
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Primer	biomers.net GmbH,
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden Ulm
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	VWR, International GmbH, Ulm

2.1.2 Lösungen und Puffer

10x PCR Puffer	Qiagen, Hilden Ulm
10x TAE Puffer (pH 8)	
96,8 g Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
22,8 ml Essigsäure	Fluka, München
40 ml EDTA	Merck, Darmstadt
Auf 2 l mit Aqua dest. auffüllen	aus Millipore-Anlage
Ladepuffer (10x)	
0,25 % Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
30 % Glycerol	Roth, Karlsruhe
Auf 100 % mit Aqua dest. Auffüllen	aus Millipore-Anlage
Laufpuffer 1x	
100 ml 10x TAE Puffer	Zusammensetzung und Herkunft s.o.
900 ml Aquadest	aus Millipore-Anlage

2.1.3 Kits

BRAF 600/601 StripAssay	Vienna Labs, Wien, Österreich
peqGOLD MicroSpin Gel Extraktions Kit	PeqlabBiotechnologie GmbH, Erlangen
QIAmp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAmp DNA mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.4 Geräte

Alpha Imager EP	Alpha Innotech, Santa Clara, USA
Analog Vortex Mixer	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG,
Analysewaagen	Sartorius, Göttingen
Elektrophorese-Systeme	VWR, Darmstadt
Gelkämme	VWR, Darmstadt
Gelträger	VWR, Darmstadt
Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss, Göttingen
Mikropipetten 2,5, 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
PCR-Thermocycler Primus 96 plus	MWG Biotech, Ebersberg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy MiniStar	VWR, Darmstadt
Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences Europe GmbH,
UV-Bank TFL 20C	Bios Corporations Germany, München
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg

2.2 Methoden

Entwurf und Ethische Zulassung

Der retrospektive Teil der Studie wurde über das Comprehensive Cancer Center Ulm (CCCU) als anonymisierte Fallstudie durchgeführt. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Standards der Ethikkommission und mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt (nach Bubolz et al., 2014).

2.2.1 Studienkohorte

2.2.1.1 Auswahl Relevanter Krankheitsbilder

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Kollektiv verschiedener histiozytärer Krankheiten anhand des Buches „WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues“ (Swerdlow et al., 2008c) erstellt. Folgende Krankheitsbilder wurden ausgewählt: Maligne Histiozytose, Langerhans-Zell-Histiozytose ohne nähere Angabe, Unifokale Langerhans-Zell-Histiozytose, Multifokale Langerhans-Zell-Histiozytose, Disseminierte Langerhans-Zell-Histiozytose, Histiozytäres Sarkom, Langerhans-Zell-Sarkom, Sarkom der dendritischen Retikulumzellen, Follikuläres Dendriten-Zell-Sarkom, Erdheim-Chester-Erkrankung, Rosai-Dorfman-Erkrankung, M. Castlemann, Juveniles Xanthogranulom, Niemann-Pick-Krankheit, Hämophagozytische Lymphohistiozytose.

Dies wurde von der Autorin ausgeführt.

2.2.1.2 Klinische Recherche mit Hilfe von Datenbanken

Entsprechend dieser Auswahl wurde das digitalisierte Patientenorganisationsystem dc pathos (dc-system Informatik GmbH, Heiligenhaus, Deutschland) für den Zeitraum von 2002 bis 2012 auf die Stichworte der jeweiligen Krankheitsbilder sowie deren ICD-10 und ICD-0-3 Diagnosen durchsucht. Die Patienten wurden mit Name,

Geschlecht und Geburtsdatum identifiziert. Daraufhin wurden aus dem Patientenverwaltungssystem der Universität Ulm (SAP, SAP Deutschland SE & Co. KG, Walldorf, Deutschland) klinische Daten der Fälle ergänzt. Dabei handelte es sich um folgende Angaben: Diagnosedatum (definiert als Tag der histopathologischen Diagnosestellung); betroffenes Organsystem/Organsysteme; mögliche Rezidive; „Life-Status“, d.h. ist der Patient am Leben oder verstorben (letztes bekanntes Datum, entweder durch einen medizinischen Befund/Kontrolluntersuchung oder eine Meldung des Einwohnermeldeamts).

Dies wurde von der Autorin ausgeführt, es wurden primär 59 Fälle ermittelt. Die anderen Rohdaten der Fälle wurden von anderen Arbeitsgruppen/Personen hinzugesteuert. Die Autorin vervollständigte in sämtlichen Fällen die Daten, kein Datensatz war bei Erhalt komplett.

2.2.1.3 Patientenkollektiv

Die so gewonnenen Daten konnten daraufhin zu einem Patientenkollektiv zusammengestellt werden, welches 113 Fälle mit klinisch, radiologisch oder histologisch gesicherter Diagnose umfasste. Mindestens zwei Fachärzte für Pathologie bestätigten jede Hauptdiagnose durch Überprüfung der ursprünglichen Abschnitte mit Hilfe von morphologischen und immunhistochemischen Kriterien (Färbungen mit Antikörpern für CD1a, S100, CD68 und ki67). Diagnostische Kriterien folgten den WHO-Richtlinien 2008. Weiterhin wurde überprüft, ob Proben mit Gewebe für molekulargenetische Analysen zur Verfügung stehen.

Folgende Definition galt für Material, welches zur Genotypisierung verwendet werden konnte:

1. Qualität: Unter einem Mikroskop musste der Tumor in einer H&E Färbung eindeutig diagnostizierbar sein. Er musste mindestens 2 x 2 mm groß sein. Er musste immunhistochemisch eindeutig identifizierbar sein.

2. Quantität: das Gewebe musste auf mindestens 10 Leerschnitten, auf einem über 3 mm dicken Paraffinblock oder bei -20 °C dauerhaft eingefroren sein.

Schlussendlich wurden so 69 Fälle zusammengestellt, in welchen eine *BRAF* Mutationsanalyse möglich war und aus welchen das endgültige Kollektiv gebildet wurde.

Das endgültige Patientenkollektiv wurde von der Autorin wie in 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben zusammengeführt und vervollständigt. Von den 69 Fällen stammten 36 Fälle aus der ursprünglichen Recherche der Autorin (siehe 2.2.1.2), welche dann in das endgültige Kollektiv aufgenommen werden konnten. Die Kriterien bezüglich der Materialverfügbarkeit wurden von der Autorin festgelegt und überprüft. Die Überprüfung durch die Fachärzte fand durch Herrn Professor Möller und Herrn PD Lennerz statt.

2.2.2 Mikrodissektion und DNA Extraktion

2.2.2.1 Mikrodissektion aus FFPE Gewebe

Die Regionen für die Mikrodissektion wurden immunhistochemisch (CD1a, S100, CD86) oder mit einer konventionellen H&E-Färbung identifiziert und Regionen mit besonders hoher Tumordichte ausgewählt und markiert. Von jedem Patienten wurden 5 Leerschnitte ausgewählt, die auf den markierten Schnitt folgten. Die Leerschnitte wurden entparaffiniert (Xylol, viermal eine Minute) und rehydriert (Ethanol, jeweils eine Minute, zweimal 100%, einmal 90%, einmal 70%) und im Folgenden an der Luft getrocknet. Darauf wurde die Region, die auf dem immunhistologisch gefärbten Schnitt markiert wurde, mit einer Skalpellspitze abgekratzt (s.u.)

Dies wurde von der Autorin durchgeführt.

2.2.2.2 DNA Extraktion

Zur Extraktion der DNA aus dem FFPE Gewebe wurde das „QIAmp DNA FFPE Tissue Kit“ verwendet, zur Extraktion aus Frischgewebe wurde das „QIAmp DNA Mini Kit“ verwendet. Die Protokolle sind bezüglich der Gewebeprevorbereitung unterschiedlich, nach dem Verdau mit der Proteinase K jedoch gleich und parallel durchführbar.

In vier Fällen wurde Gewebe verwendet, welche bei - 20°C eingefroren war. Dieses Gewebe diente ursprünglich der Schnellschnittdiagnostic und war von einem Haftmedium, welches bei Kälte hart wird (sog. TissueTek®) umgeben. Von diesem Gewebe wurden mit einem Mikrotom drei 10 µm dicke Schnitte in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Es wurden 180 µl ATL Puffer sowie 20 µl Proteinase K hinzugefügt und über Nacht bei 56°C verdaut.

In den restlichen 65 Fällen erfolgte die DNA Extraktion aus FFPE Gewebe.

Dabei wurde eine Skalpellspitze mit ATL Puffer benetzt um ein Haften des Materials zu gewährleisten, da dieses nach Entparafinierung (siehe 2.2.2.1) sehr trocken war. Nachdem die gewünschte Region abgetragen war, wurde die Skalpellspitze, an welcher das Gewebe haftete, in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß getaucht, welches mit 180 µl ATL Puffer gefüllt war. Dann wurden 20 µl Proteinase K zugefügt und bei 56 °C über Nacht verdaut. Um die Formaldehyd Modifikation rückgängig zu machen, wurde das Lysat danach bei 90 °C für eine Stunde inkubiert.

Gemeinsam konnten die Proben dem gleichen Protokoll folgen: Um eventuell entstandenes Kondensat aus dem Deckel in das Mikroreaktionsgefäß zurück zu bringen, wurde das Lysat kurz zentrifugiert. Danach wurden 200 µl AL Puffer zur Probe gefügt, und durch Vortexen gemischt. Daraufhin wurden 200 µl 100%iges Ethanol zugefügt und wieder gemischt. Das gesamte Lysat wurde auf eine „QIAamp MinElute Säule“ im Fall des FFPE Gewebes, „QIAamp Mini Spin Säule“ im Falle des

Frischgewebes, überführt, welche in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß steckte, der Deckel geschlossen und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein sauberes 2 ml Mikroreaktionsgefäß gestellt, der Durchfluss wurde entsorgt. Die Säulen wurde geöffnet und 500 µl AW1 Puffer zugefügt. Nach schließen des Deckels wurde bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Säulen wurden wiederum in ein sauberes 2 ml Mikroreaktionsgefäß gestellt und Durchfluss entsorgt. Darauf wurden die Säulen geöffnet und 500 µl AW2 Puffer zugefügt. Danach wurde der Deckel erneut geschlossen und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein sauberes 2 ml Mikroreaktionsgefäß gestellt, der Durchfluss wurde entsorgt. Danach wurde bei 14.000 rpm für 3 min zentrifugiert, um die Membran vollständig zu trocknen. Darauf wurden die Säulen in ein sauberes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gestellt, der Durchfluss wurde verworfen. Nach Öffnen des Deckels der Säule wurden 100 µl ATE Puffer auf das Zentrum der Membran appliziert. Abschließend wurde bei Raumtemperatur für 1 min bei voller Geschwindigkeit 14.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat enthielt nun die aufgereinigte DNA.

Dies wurde von der Autorin durchgeführt. Für das FFPE Gewebe stellte mir Frau Dr. Silke Brüderlein Gewebe der Zelllinie U-DCS als Negativkontrolle zur Verfügung, welches sie zuvor als FFPE Gewebe aufgearbeitet hatte.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe eines Ultrospec 2100pro bestimmt. Das Gerät wurde zunächst mit destilliertem Wasser kalibriert, zur Messung wurde eine pathlength von 10 mm und ein Verdünnungsfaktor von 10 gewählt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm bestimmt. Es wurde 1 µl der aufgereinigten DNA Lösung aufgetragen.

Bei der Annahme, dass die optische Dichte=1 beträgt, würde bei 260 nm Wellenlänge eine DNA Konzentration von 50 µg/µl vorliegen. Angegeben wird ein Verhältnis

(Ratio) der Extinktion zwischen 260 nm und 280 nm, welches den Reinheitsgrad der Probe angibt. Dieses sollte für die DNA über 1,8 liegen.

Entsprechend des Ergebnisses wurde die DNA verdünnt, um eine optimale Sequenzierung zu ermöglichen.

Dies wurde von der Autorin durchgeführt

2.2.3 Molekulargenetische Analyse

2.2.3.1 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der DNA erfolgte über eine PCR unter Verwendung der Primer: F-5'-TGC-TTG-CTC-TGA-TAG-GAA-AAT-G-3' und R-5'-AGC-ATC-TCA-GGG-CCA-AAA-AT-3'. Um sterile Arbeitsbedingungen zu schaffen wurde unter einer UV-Bank gearbeitet. Diese wurde zu Beginn für 20 min in Betrieb genommen und in diesem Schritt wurden die 500 µl Mikroreaktionsgefäße mit UV-Licht sterilisiert. Insgesamt sollte eine Menge von 51,5 µl als Basis der PCR dienen, dafür wurde ein Master-Mix, bestehend aus 45 µl destilliertem Wasser; 5 µl 10x Puffer; 0,5 µl Primer Mix; 0,5 µl dNTPs, 0,5 µl TAQ Polymerase pro zu analysierender Probe hergestellt, worauf je 3 µl DNA gegeben wurden.

Mastermix

45	µl	aqua dest.
5	µl	10x Puffer
0,5	µl	Primer Mix
0,5	µl	dNTPs
0,5	µl	TAQ
3	µl	DNA

Folgendes Protokoll wurde für die PCR angewendet:

	<u>Denaturierung</u>	<u>95°C</u>	<u>5 min</u>
	Denaturierung	95°C	30 sec
2x	Annealing	62°C	30 sec
	<u>Elongation</u>	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>
	Denaturierung	95°C	30 sec
2x	Annealing	60°C	30 sec
	<u>Elongation</u>	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>
	Denaturierung	95°C	30 sec
2x	Annealing	58°C	30 sec
	<u>Elongation</u>	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>
	Denaturierung	95°C	30 sec
35x	Annealing	58°C	30 sec
	<u>Elongation</u>	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>
	Elongation	72°C	10 min

Dies wurde von der Autorin durchgeführt.

2.2.3.2 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des PCR-Ergebnisses erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden 1,5 g Agarose in je 100 ml TAE-Puffer gegeben und zum vollständigen Lösen der Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurden drei Tropfen Ethidiumbromid zu der Lösung gegeben und ein 1,5% Gel hergestellt. In die erste Kammer wurde bei jedem Gel eine DNA Leiter (100 bp -Leiter) aufgetragen, in die anderen Taschen wurde ein Aliquot von 15 µl des PCR Ansatzes, gemischt mit einem Tropfen Ladepuffer, pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 Volt, 400 mA für 30 min.

Dies wurde von der Autorin durchgeführt.

2.2.3.3 Aufreinigen von DNA aus dem Argarosegel

Zum Aufreinigen der DNA aus dem Argarosegel wurde das „peqGOLD MicroSpin Gel Extraktions Kit“ genutzt. Zuerst erfolgte das Lösen der Agarose. Dazu wurden die zuvor aus dem Argarosegel getrennten Fragmente gewogen. Wog ein Fragment über 150 mg wurden 1ml GP-Puffer hinzugefügt, wog das Fragment 150 mg oder weniger wurde 500µl GP-Puffer hinzugefügt. In der Folge wurden die Mikroreaktionsgefäße 10 min in einem 50 °C heißen Wasserbad erhitzt und alle 2 Minuten gevortext.

Um die DNA zu extrahieren wurde zu den ursprünglichen 500 µl GP-Puffer weitere 250 µl MCP-Puffer, zu den ursprünglich 1 ml GP-Puffer weitere 500 µl MCP-Puffer zugefügt. Je 750 µl wurden in der Folge in eine „PerfectBind MicroSpin DNA Säule“ aufgetragen und 1 min bei 10.500 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, im Fall der höheren Volumina wurde die gleiche Säule erneut befüllt und der vorherige Schritt wiederholt

Zum Herauslösen der DNA aus der Matrix der „PerfectBind MicroSpin DNA Säule“ wurde diese mit 700 µl komplettierter Waschpuffer 3 min inkubiert und dann 1 min bei 10.500 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Daraufhin wurden 700 µl Waschpuffer CG auf die Säule pipettiert und wiederum 1 min bei 10.500 rpm zentrifugiert. Zum Trocknen der „PerfectBind“ Säulenmatrix wurde die Säule wiederum bei 10.500 rpm zentrifugiert und der letztendlich entstandene Durchfluss verworfen.

Um die DNA aus der „PerfectBind“ Säulenmatrix zu lösen, wurde auf diese 15 µl Elutionspuffer pipettiert und bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Daraufhin wurde in einem letzten Schritt 1 min bei 10.500 rpm zentrifugiert, das Zentrifugat enthielt nun die gereinigte DNA.

Dies wurde von der Autorin ausgeführt.

2.2.4 Sequenzierung

2.2.4.1 Pyrosequenzierung

Das Prinzip der Pyrosequenzierung basiert auf der kontinuierlichen Synthese von DNA Sequenzen und Analyse der entstehenden Reaktion. Um Einzelstrang DNA zu erhalten, wird die DNA dabei thermisch denaturiert, darauf ein Sequenzierungsprimer auf die Einzelstrang-DNA-Matrize hybridisiert und mit Hilfe der Substrate Luciferin und Adenosin-5'-phosphosulfat sowie den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase wird der komplementäre Strang synthetisiert. Dazu erfolgt die Zugabe des ersten von vier Nukleotiden. Sollte das Nukleotid komplementär zu der Base des Matrizenstrangs sein, wird es durch die DNA-Polymerase in die Einzelstrang-DNA eingebaut und doppelsträngige DNA entsteht. Diese Reaktion wird durch die Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) in einer äquimolaren Menge zu der Menge des eingebauten Nukleotid begleitet. Die ATP-Sulfurylase wandelt die Menge an entstandenem PPi in der Anwesenheit von Adenosin-5'-phosphosulfat quantitativ in ATP um, was wiederum die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin durch Luciferase antreibt. Dies führt zur Erzeugung von sichtbarem Licht, welches proportional zu der Menge an ATP ist. Das Licht wird mit ladungsgekoppelten Vorrichtungen (CCD Sensoren) gemessen und erscheint als Peak im Pyrogram®. Jedes Lichtsignal ist proportional zu der Anzahl der eingebauten Nukleotide, das heißt die unterschiedliche Peakhöhen ergeben die Sequenz, in der höhere Peaks für wiederholt eingebaute Nukleotide stehen (Abbildung 4a).

Die Durchführung erfolgte in 62 Fällen in der varionostic GmbH von Herrn Dr. Uwe Gerstemaier. Das obige Protokoll orientiert sich an der Erklärung von Herrn Dr. Gerstenmaier und dem Pyromark Q24 User Manual (Qiagen, Hilden, Deutschland).

2.2.4.2 BRAF 600/601 StripAssay

Alternativ wurden Mutationsanalysen unter Verwendung des BRAF 600/601 StripAssay (Vienna Labs, Wien, Österreich) durchgeführt. Die Hybridisierung der amplifizierten DNA erfolgte bei 45 °C in einem Schüttelwasserbad. Die Temperatur des Wasserbads wurde mit einem kalibrierten Thermometer überprüft. Dann erfolgte das Erwärmen des Hybridisierungspuffers und der Waschlösung A (*Wash Solution A*) bis 45 °C, während die Teststreifen, die Denaturierungslösung (*DNAT*), die Konjugatlösung, die Waschlösung B (*Wash Solution B*) und der Farbentwickler bei Raumtemperatur verblieben. Es wurden je 10 µl Denaturierungslösung in die untere Ecke jeder Spur und 10 µl DNA in den jeweiligen Tropfen Denaturierungslösung der entsprechenden Spur pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Darauf wurde je 1 ml erwärmter Hybridisierungspuffer in jede Spur zugefügt und die Teststreifen mit der markierten Seite nach oben in die entsprechenden Spuren gelegt und vollständig untergetaucht. Danach erfolgte eine erneute Inkubation für 30 min bei 45 °C in einem Schüttelwasserbad. Nach Beendigung wurde die Hybridisierungslösung entfernt und es erfolgte die Wäsche der Teststreifen. Dazu wurde zuerst mit 1 ml Waschlösung A für 10 sec gespült, die Flüssigkeit entfernt und darauf mit einem ml Waschlösung A für 15 min bei 45 °C inkubiert, danach die Flüssigkeit entfernt und die entsprechenden Schritte wiederholt. Zur Farbentwicklung der Markierungen auf den Teststreifen wurde im Weiteren 1 ml Konjugatlösung zugefügt, für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und die Flüssigkeit danach entfernt. Darauf wurde mit einem ml Waschlösung B für 10 sec gespült und die Flüssigkeit wiederum entfernt. Nach erneutem Zufügen von einem ml Waschlösung B erfolgte die Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden die entsprechenden Schritte wiederholt. Zum Schluss wurde 1 ml Farbentwickler zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert und die Teststreifen danach mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen (Abbildung 4b)

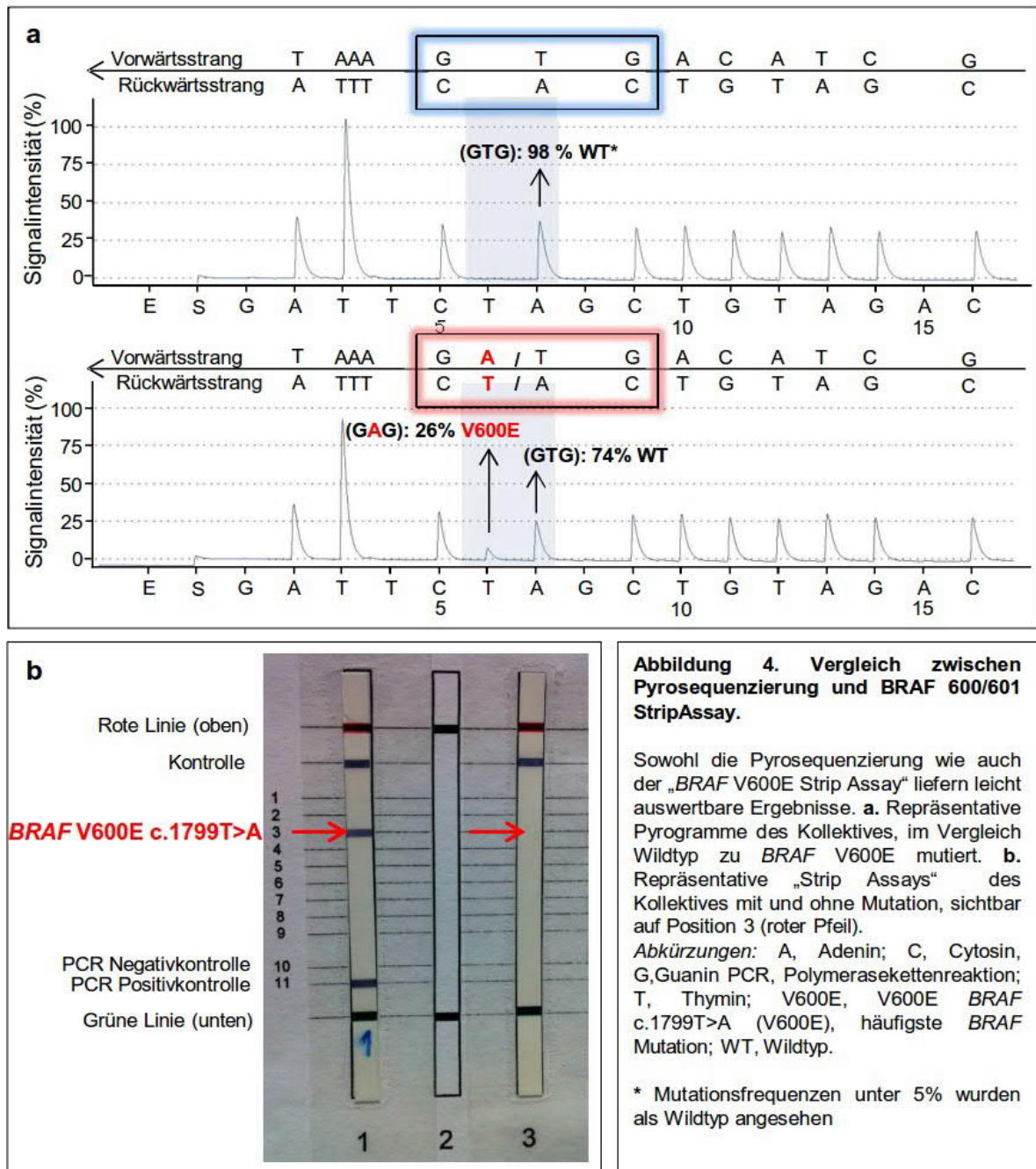
Die Durchführung erfolgte in sieben Fällen im Bundeswehrkrankenhaus Ulm von Frau Dr. Anette Arndt und Herrn Dr. Dr. Konrad Steinestel. Das obige Protokoll orientiert sich an der Erklärung von Frau Dr. Arndt und Herrn Dr. Dr. Steinestel und den „BRAF 600/601 StripAssay® Instructions for use“ (Vienna Labs, Wien, Österreich)

2.2.5 Auswertung

2.2.5.1 Auswertung der Genotypisierung

Die Auswertung der Ergebnisse der Genotypisierung erfolgte über die Analyse der Pyrogramme bzw. über die Auswertung der Markierungen des „BRAF 600/601Strip Assays“ (Abbildung 4). Über Auswertung der entstandenen Peaks und der entsprechenden Peakhöhen in Verbindung mit der Signalintensität konnte eine Aussage über den Genotyp getroffen werden. Bei den Pyrogrammen galt eine Mutationsfrequenz unter 5% als Wildtyp-Sequenz (Abbildung 4a). Bei dem „BRAF 600/601Strip Assay“ ergab sich eine entsprechende Farbmarkierung, wenn eine Mutation detektiert wurde, wobei unterschiedliche Mutationen in unterschiedlichen Regionen angezeigt wurden (Abbildung 4b).

Dies wurde durch die Autorin durchgeführt. Die Abbildung 4 wurde von der Autorin erstellt, indem die Sequenzierungsergebnisse aufgearbeitet wurden.



2.2.5.2 Auswertung der Literatur

Zwei elektronische Datenbanken (Medline, Scopus) wurden unabhängig voneinander mit Hilfe der Suchbegriffe histiocytoid, Langerhans, Erdheim, „bone“ oder „lung“ in Verbindung mit *BRAF* V600E durchsucht (Intervall Januar 1976 - Februar 2014). Darüber hinaus wurde eine Überprüfung der Referenzlisten in allen ausgewählten Artikeln zusätzlich zu Studien, die *BRAF*-Mutationsanalysen enthielten, durchgeführt. Für jede Studie (Alayed et al., 2013; Arceci et al., 2013; Badalian-Very et al., 2010; Berres et al., 2014; Chilosì et al., 2014; Fu et al., 2013; Halfacre et al., 2012; Haroche et al., 2012; Peters et al., 2011; Roden et al., 2014; Romano et al., 2014; Sahm et al., 2012; Satoh et al., 2012; Wei et al., 2013; Yuan et al., 2013) wurde der histologische Subtyp der Läsion, der *BRAF*-Mutationsstatus und die Gesamtzahl der mutierten und analysierten Fälle festgestellt. Für alle Fälle wurde die Gesamt-*BRAF*-Mutationsfrequenz zusammen mit einem Konfidenzniveau von 95% unter der Annahme einer Binomialverteilung aufgelistet (Abbildung 5). Zur Vereinfachung der Darstellung wurden Fallberichte und Kleinserien (kleiner bzw. gleich zehn Patienten) in einer Kategorie zusammengefasst (Bates et al., 2013; Ducassou et al., 2013; Haroche et al., 2013; Kamionek et al., 2012; Kansal et al., 2013; Milne et al., 2013; Mitchell et al., 2012; O'Malley et al., 2014; Oishi et al., 2014; Sun et al., 2013; West et al., 2013; Yoon et al., 2013; Yousem et al., 2013) (nach Bubolz et al., 2014).

Dies wurde von der Autorin ausgeführt. Anschließend wurde die Suche von zwei unabhängigen Mitarbeitern (PD Jochen Lennerz und Dr. Stephanie Weissinger) des Instituts für Pathologie der Universität Ulm wiederholt, um auszuschließen, dass Fälle übersehen worden sein könnten, was jedoch nicht der Fall war.

2.2.6 Statistische Analyse

Für statistische Vergleiche der Mutationsfrequenzen wurde im bezüglich des Geschlechts, der Krankheitsausprägung und der Organmanifestation der Exakte-Fisher-Test oder Chi-Quadrat-Test durchgeführt, zum Vergleich des Alters diente der *t*-Test, bei dem $P < 0,05$ als statistisch signifikant galt. Um den diagnostischen Wert der *BRAF*-Genotypisierung in LCH zu eruieren, wurde ermittelt, ob die Quantifizierung der Peakhöhen der mutierten Fälle (in der Pyrosequenzierung) als Surrogatmarker für die Schätzung des histiozytären Infiltrats dienen könnte.

Die Outcome-Analyse bestand aus vier Elementen: a) Insgesamt sowie b) progressionsfreies Überleben, definiert als die Zeitspanne zwischen Diagnose und Tod oder Rezidiv/Progression; c) dem Anteil der therapieansprechenden und therapieresistenten Patienten und d) dem zeitlichen Verlauf der Ereignisse in der therapieresistenten Untergruppe. Als therapieresistent wurden Patienten mit stabiler Erkrankung, fortschreitender Krankheit oder Rezidiv definiert, während Patienten mit teilweiser oder vollständiger Remission als therapiesensibel definiert wurden. Für eine Ereigniszeitanalyse wurde der Zeitrahmen von der ersten Diagnose bis zum ersten Ereignis (definiert als diagnostizierte stabile oder fortschreitende Krankheit oder Rezidiv) ermittelt, die als geplottete Ereignis-Kurven mit Hilfe eines Log-Rang-Tests aufgetragen wurden (nach Bubolz et al., 2014).

Dies wurde von der Autorin ausgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Metaanalyse der BRAF Mutationsfrequenzen bei LCH

Um die Aussagekraft der Mutationsanalysen des Kollektivs der Universität Ulm zu überprüfen, wurde eine Metaanalyse der bestehenden Literatur angefertigt (Abbildung 5). Insgesamt liegt die gemittelte Mutationsfrequenz zwischen den Jahren 2010 bis 2014 mit über 600 getesteten Fällen bei 48,5% (95% Konfidenzniveau: 44,7% bis 52,5%). Dabei wird deutlich, dass es sich bei der *BRAF* Mutation um ein häufiges Vorkommen handelt und die Detektionsraten, mit wenigen Ausnahmen, nur minimal schwanken.

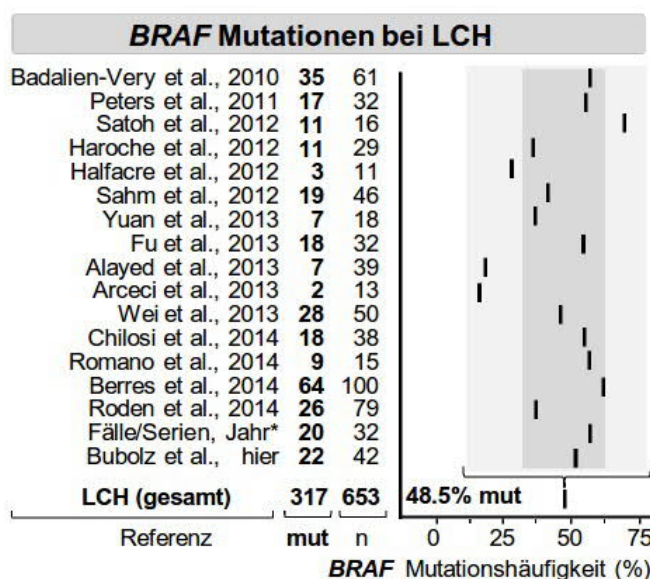


Abbildung 5: Metaanalyse der Mutationsfrequenzen der BRAF Genotypisierungen bei Langerhans-Zell-Histiozytosen, nach Bubolz et al., 2014.

*Insgesamt wurden 13 Fallberichte/Serien zusammengefasst (siehe Methoden 2.2.5.2). Auf der X-Achse wird der Durchschnitt aller Studien mit einem Konfidenzniveau von 95% unter der Annahme einer Binomialverteilung für alle enthaltenen Fälle (dunkel hervorgehoben) dargestellt. Abkürzungen: et al., et alii, et aliae, et alia; LCH, Langerhans-Zell-Histiozytose; mut, mutiert; n, Fallzahl.

Hierzu zählen unter anderem die einzelnen Fallberichte/Kleinserien. Betrachtet man deren Zusammenfassung wird deutlich, dass die Mutationsrate in dieser Gruppe mit zu den höchsten zählt (Abb. 5). In dem Vergleich mit den ermittelten Mutationsfrequenzen anderer Arbeitsgruppen liegt das Ergebnis des Kollektivs der Universität Ulm mit 52% *BRAF* Mutationen bei der Langerhans-Zell-Histiozytose innerhalb des Konfidenzniveaus und bestätigt sich somit als repräsentatives Kollektiv für die statistische Analyse.

3.2. Genotypisierung

3.2.1 Mutationsfrequenz nach Entitäten

Die Mutationsanalyse der 69 Patientenproben und Genotypisierungsergebnisse der histologischen Subtypen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Resultate der *BRAF* Genotypisierung nach histologischem Subtyp nach Bubolz et al, 2014. Abkürzungen: n, Fallzahl; No. mut., Anzahl mutierter Fälle.

Histologischer Subtyp	Total	<i>BRAF</i> V600E	
	n=69	No. mut.	%
Langerhans-Zell assoziierte Tumore	48	23	48
Langerhans-Zell-Histiozytose	42	22	52
Lokalisiert/unifokal	25	12	48
Multifokal	13	7	54
Disseminiert/viszeral	4	3	75
Langerhans-Zell-Sarkom	6	1	17
Non-Langerhans-Zell Entitäten	21	0	0
Follikuläres Dendriten-Zell-Sarkom	3	0	0
Juveniles Xanthogranulom	3	0	0
Rosai-Dorfman-Erkrankung	4	0	0
Granularzelltumor	11	0	0

Innerhalb der Gruppe der Non-Langerhans-Zell Entitäten konnte keine *BRAF* Mutation nachgewiesen werden. Die zusätzlich getesteten Granularzelltumore, welche wegen ihres ähnlichen immunhistochemischen Profils (Abb. 2) ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt wurden, zeigten durchgängig einen *BRAF* Wildtyp.

Die Genotypisierung der von Langerhans-Zellen abgeleiteten Läsionen ergab, bei 48 getesteten Fällen, insgesamt 23 *BRAF* V600E Mutationen (= 47,9%), die Krankheitsbilder unterschieden sich jedoch in der Höhe der jeweiligen Mutationsfrequenz.

Während die Langerhans-Zell-Histiozytose eine Mutationsrate von 52% (48% bis 75% je nach Ausprägung) aufwies und die Mutationsfrequenz der LCH in sich in keinem statistischen Zusammenhang zu dem Befall einzelner bzw. mehrerer Organsysteme ($P=0,54$ Fisher) stand, steht diese dennoch in deutlichem Unterschied zum Langerhans-Zell-Sarkom. Von den sechs getesteten Langerhans-Zell-Sarkomen wurde lediglich eine *BRAF* V600E Mutation bei einem 71 Jahre alten Mann festgestellt (17%), welcher drei Monate nach der Diagnose verstorben ist (Abbildung 6a).

3.2.2 Mutationsanalysen in der Gruppe der Langerhans-Zell-Histiozytose

3.2.2.1 Diagnostischer Wert

Die Zielsetzung der Arbeit war unter anderem den diagnostischen Wert des *BRAF* Mutationsstatus zu eruieren und die Frage zu beantworten, ob der Mutationsstatus alleine Aufschluss über das klinische Erscheinungsbild bzw. den Verlauf geben kann. Aus diesem Grund wurde das Vorkommen einer Mutation bzw. eines Wildtyps mit üblichen prädestinierenden Faktoren verglichen. Allerdings gab es in diesem Fall weder signifikante Assoziationen mit Alter, Geschlecht, „Stage“ (d.h. Systembeteiligung) noch mit dem betroffenen Organ/Organsystemen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Demografische und klinische Charakteristika Genotyp-spezifischer Subtypen von Patienten mit Langerhans-Zell-Histiozytose nach Bubolz et al., 2014.

Die *P*-Werte stammen aus Kontingenztests (*t*-Test bezüglich des Alters, Exakter-Fischer-Test bezüglich dichotomer Faktoren). *Anmerkung:* in dem Tabellenabschnitt „Organmanifestation“ repräsentieren die Prozentangaben die Fraktionen der mutierten bzw. Wildtyp Fälle in jeder Kategorie (lineare Vergleiche). *Abkürzungen:* n, Fallzahl; No, Fallanzahl pro Charakteristik; unifokal, Befall eines Organsystems; Multifokal, Befall von $\leq$ zwei verschiedener Organsystemen.

Charakteristika	No.	<i>BRAF</i> mutiert (n=22)	No.	<i>BRAF</i> Wildtyp (n=20)	<i>P</i>
		%		%	
Alter (Jahre)					
Median	13		15		0.68
Intervall	0.6-65		0.6-57		
Geschlecht					
Männlich	10	45	12	60	0.37
Weiblich	12	55	8	40	
Stadium					
Unifokal	12	55	13	65	0.54
Multifokal	10	45	7	35	
Organmanifestation					
Knochen (n=23)					
Unifokal (n=17)	9	53	8	47	0.66
Multifokal (n=6)	4	67	2	33	
Lunge (n=11)					
Unifokal (n=4)	1	25	3	75	1.0
Multifokal (n=7)	2	29	5	71	
Haut (n=6)					
Unifokal (n=4)	4	100	0	0	0.33
Multifokal (n=2)	1	50	1	50	

In der Diagnose der LCH ist die Multifokalität ein wichtiges Kriterium, welches die Therapie und Prognose entscheidend mit bestimmt, jedoch häufig schwierig zu beurteilen ist. Wie oben bereits erwähnt, ließen sich anhand des Mutationsstatus keine statistischen Aussagen über ein Patientenprofil oder bezüglich des Ortes oder der Ausprägung der histiozytären Läsionen treffen. Andersherum ließ sich auch kein Risikoprofil erstellen, in welchem das Auftreten einer *BRAF* mutierten Langerhans-Zell-Histiozytose wahrscheinlich wäre.

Um eine dezidierte Aussage treffen zu können, wurden, entsprechend der häufigsten Lokalisationen, Haut-, Knochen- und Lungenläsionen erneut bezüglich des *BRAF* Genotyps getestet. Auch innerhalb dieser genaueren Testung konnten keine signifikanten Assoziationen gefunden werden (Tabelle 2).

Im Bereich der Lunge wurden sieben Lungenbiopsien getestet, welche sich zwischen isoliertem Lungenbefall und Lungenbefall mit systemischer Beteiligung unterschieden. Im Fall der systemischen Beteiligung zeigte sich eine etwas höhere Mutationsfrequenz (2 von 7= 28,6%) im Gegensatz zu den lokalisierten Fällen (1 von 4= 25%); diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant ($P= 1,00$; Fisher). Diese Ergebnisse gleichen sich bezüglich des Befalls des Skelettsystems. Auch hier ließ sich eine relativ hohe Rate von *BRAF* Mutationen bei Multi-System-LCH mit Knochenbeteiligung ($n = 4/6 = 66,6\%$) nachweisen, welche gegenüber dem unifokalen Knochenbefall (9 von 17= 52,9%) jedoch ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied zeigte.

Die Ausnahme bildete die *BRAF*-Mutationsrate in allen vier getesteten Fällen von Langerhans-Zell-Histiozytosen, in welchen ausschließlich die Haut betroffen war. Hier ließ sich eine Mutationsrate von 100% nachweisen, jedoch ohne statistische Relevanz im Vergleich zu einem multifokalen Befall mit Hautbeteiligung (4/4 gegenüber 1/2, $P= 0,33$).

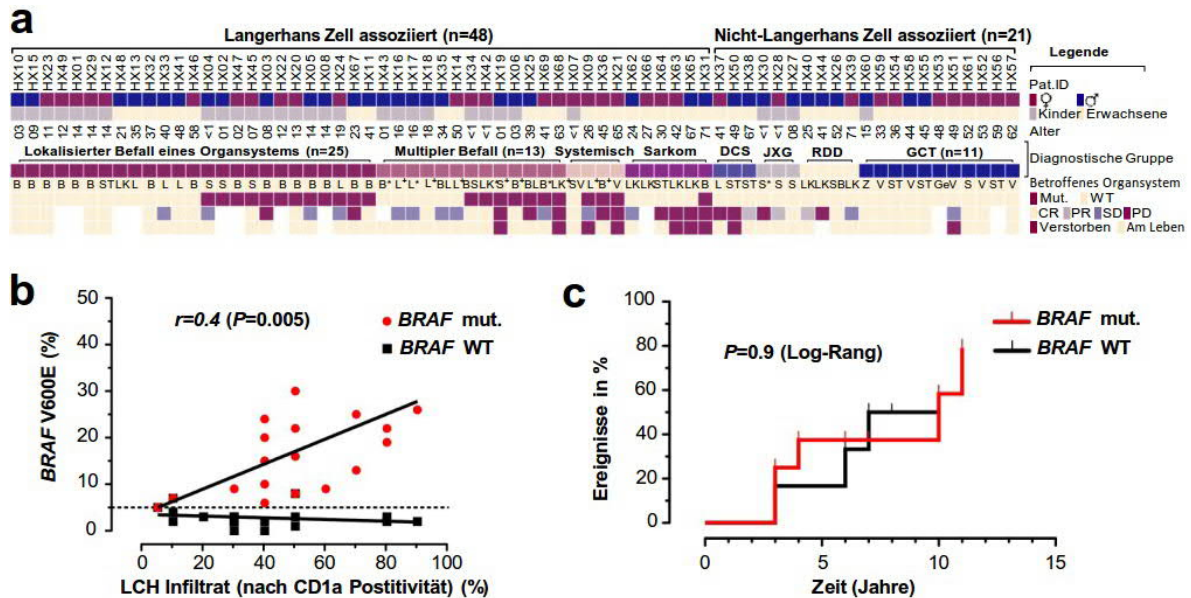


Abbildung 6. BRAF-Mutationsanalyse mit Fallanalyse und Korrelation mit Tumorzellichte und Ereignisrate bei Therapierefraktären Patienten, nach Bubolz et al., 2014.

a. Klinisch-pathologische Krankheitsmerkmale jedes einzelnen Patienten sowie Genotypisierungsergebnis und codierte Ergebnisdaten. Die Proben werden als Spalten angezeigt und durch Krankheitsbild, BRAF-Mutationsstatus und Alter angeordnet. b. Korrelation von histiozytärem Infiltrat (in Abhängigkeit von CD1a Positivität) mit Peak-Höhen Quantifizierung von Pyrosequenzierung in 19 BRAF V600E mutierten und 19 LCH Wildtyp Fällen. c. Kumulative Ereignisrate (stabile Erkrankung, Rezidiv, Progression) bei Patienten mit Multiplen Organbefall-oder systemischer Erkrankung nach dem BRAF-Mutationsstatus. Abkürzungen: *, multipler Organbefall; +, Beteiligung Zentrales Nervensystem/zusätzliches Organ; B, Knochenbeteiligung; BS, Knochen- und Hautbeteiligung; CR, komplette Remission; DCS, Sarkom der dendritischen Zellen; JXG, juveniles Xanthogranulom; Ge, Genital; GCT, Granularzell Tumor; L, Lungenbeteiligung; LCH, Langerhans-Zell-Histiozytose; LK, Lymphknoten; mut, mutiert; n, Fallzahl; Pat. ID, Patienten Identifikationsnummer; PD, progressive Erkrankung; PR, partielle Remission; RDD, Rosai-Dorfman Krankheit; S, *Skin*, Hautbeteiligung; SD, stabile Erkrankung; ST, *Soft-tissue*, Weichteilbeteiligung; V, viszerale Beteiligung; WT, Wildtyp; Z, Beteiligung der Zunge.

Um den besagten diagnostischen Wert der *BRAF*-Genotypisierung bei LCH zu eruieren, wurde zudem ermittelt, ob die Quantifizierung der Peakhöhen der Pyrogramme in den mutierten Fällen als Surrogatmarker für die Einschätzung der Menge an histiozytärem Infiltrat dienen könnte. Hier wurde eine signifikante Korrelation zwischen Peakhöhen und CD1a Färbung festgestellt (Abbildung 6b), was auf eine stabile Beziehung zwischen der Gesamtmenge des mutierten Allels und CD1a-positivem Infiltrat hinweist (nach Bubolz et al., 2014)

3.2.2.2 Prognostischer Wert

Obwohl der *BRAF* Mutationsstatus keine Aussage über ein bestimmtes Patientenprofil zulässt, könnte er dennoch prognostische Informationen bezüglich des zu erwartenden Krankheitsverlaufs liefern. Während das Überleben von unifokal erkrankten Patienten unabhängig von ihrem *BRAF* Status hoch ist (Abb. 6a), ergibt sich bei dem allgemeinen und progressionsfreien Überleben von *BRAF*-Wildtyp und *BRAF*-mutierten Patienten jedoch kein signifikanter Unterschied ($P = 0,68$ PFS, $P = 0,37$ OS, Log-Rang).

3.2.2.3 Therapeutischer Wert

Darüber hinaus wurde untersucht, ob der *BRAF*-Mutationsstatus zwischen therapieansprechenden und therapieresistenten Patienten unterscheiden kann. In den 18 Fällen mit nachgewiesener Mutation und Outcome-Informationen wurden zwölf therapieresistente Patienten identifiziert (66,6%), während es fünf therapieresistente unter den 15 Wildtyp-Fällen gab (33,3%); dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($P = 0,084$; Fisher). Somit erlaubt der *BRAF*-Mutationsstatus keine Unterscheidung zwischen Patienten, welche auf die Therapie ansprechen und therapieresistenten Patienten.

Zusätzlich wurde untersucht, ob der *BRAF*-Mutationsstatus einem unterschiedlichen Krankheitsverlauf (z.B. Progression oder Rezidiv) in der therapieresistenten Gruppe zugeordnet werden konnte. Bei der Aufschlüsselung nach Genotyp zeigten sich im zeitlichen Verlauf jedoch keine Unterschiede (Abb. 6c)(nach Bubolz et al., 2014)

3.3 Patientenauswahl für eine BRAF Inhibitor Therapie

Im Folgenden wurden, auf Basis der hohen *BRAF*-Mutationsraten und nach Rücksprache mit den klinischen Kollegen speziell therapierefraktäre LCH-Patienten auf *BRAF*-Mutationen hin untersucht, um einen möglichen Therapieansatz zu schaffen. Gemeinsam wurden 17 Fälle identifiziert und, sofern noch nicht vorhanden, von der Autorin dem Kollektiv zugefügt und die Daten ergänzt. Zum Zeitpunkte der Analyse waren zehn der 17 Fälle nicht mehr ausreichend dokumentiert, vier Patienten waren verstorben und nur drei bis dato therapierefraktäre Patienten, die eine zusätzliche Behandlung benötigten, waren am Leben. Zwei der drei Patienten waren Kinder (davon war lediglich der eine *BRAF* mutiert und erhielt Second-Line

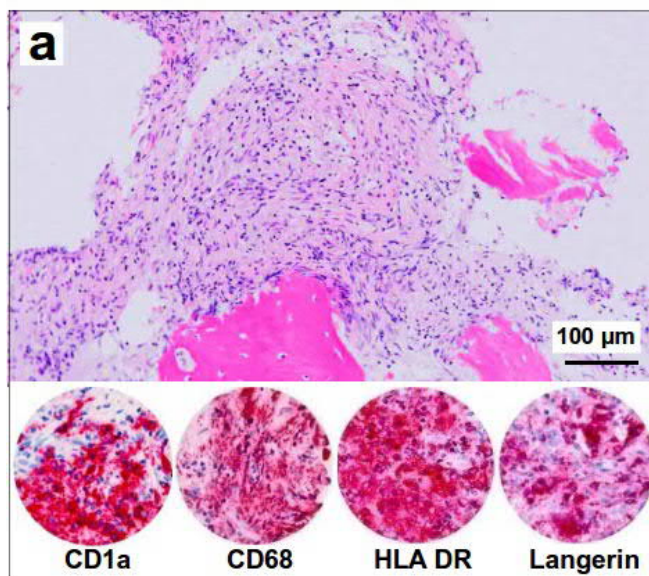


Abbildung 7: Histologie und Immunphänotyp einer Langerhans-Zell-Histiozytose, nach Bubolz et al., 2014.

a. Knochenmark-Biopsie mit einem dichten histiozytären Infiltrat mit reaktiver Resorption von Lamellenknochen und Durchsetzung des Knochenmarks. Morphologie und Immunphänotyp (repräsentative Bilder des Immunphänotyps) sind pathognomonisch für die LCH (H&E und alkalische Phosphatase Immunhistochemie). Abkürzungen: µm, micrometer; CD1a, Cluster of Differentiation 1a Protein; CD68, Cluster of Differentiation 68 Protein; H&E, Hämatoxylin-Eosin-Färbung; HLA-DR, Humanes Leukozytenantigen der Klasse II; LCH, Langerhans-Zell-Histiozytose.

Chemotherapie). Die dritte Patientin war eine 45-jährige Frau mit multifokaler und multisystemischer, *BRAF* V600E mutierter Histiozytose mit mehreren Knochenläsionen (Patientin HX36).

Die Diagnose war histologisch und immunphänotypisch eindeutig (Abb. 7a). Die Patientin litt unter orbitalen wie auch meningealen Läsionen sowie einer Infiltration der Hypophyse und des Hypothalamus, jedoch ohne manifesten Diabetes insipidus. Des Weiteren hatte die Patientin einen schweren, Insulin-abhängigen Diabetes mellitus mit normalen Cortisol- und ACTH-Niveaus (nach Bubolz et al., 2014).

4. Diskussion

Zu Beginn der Arbeit an diesem Projekt gab es eine führende Studie, welche als erste *BRAF* Mutationen in ca. 60% der Fälle von Langerhans-Zell-Histiozytosen nachwies (Badalian-Verly et al., 2010). Um die Ergebnisse zu verifizieren habe ich ein deutsches Patientenkollektiv aus Patienten, welche an histiozytären Krankheitsbildern litten, erstellt und auf *BRAF* Mutationen hin untersucht. Da im Laufe der Arbeit deutlich wurde, dass es viele Arbeitsgruppen mit ähnlichen Ansätzen gab, die Ergebnisse jedoch noch nicht gebündelt wurden, schloss ich in der Folge eine Metaanalyse der Literatur an, auch um zu eruieren, ob sich meine Ergebnisse mit denen anderer Forschungsgruppen decken.

Die Ergebnisse meiner Studie zeigen, dass sich *BRAF*-V600E-Mutationen histiozytärer Läsionen auf Tumoren der Langerhans-Zell-Linie beschränken und dass der Mutationsstatus im Fall der Langerhans-Zell-Histiozytose zwar weder Informationen über die Krankheitslokalisation liefert noch prognostischen Wert besitzt, weiterführend jedoch trotzdem von klinischer Relevanz sein kann.

4.1 Methoden der Mutationsanalyse

4.1.1 Isolierung von DNA aus Frischgewebe

Zu den üblichen Methoden in der Pathologie zählt der sog. Schnellschnitt. Dieser ermöglicht eine intraoperative Diagnostik zur Beurteilung von Gewebe. Für diese Methode wird das gewonnene Material in „Tissue Tek®“ eingebettet, welches aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen besteht und bei -10°C fest wird. Nach Beenden des Schnellschnitts kann das Gewebe bei -20 °C asserviert werden.

In insgesamt 4 Fällen des Kollektivs stand ausschließlich Gewebe zur Verfügung, welches zuvor für die Schnellschnittdiagnostik genutzt wurde. Für die DNA Extraktion stand eine etablierte Methode in Form eines Kits zur Verfügung (QIamp DNA Mini

Kit“). Das Material wurde mit Hilfe eines Mikrotoms gewonnen (siehe 2.2.2.2). Das Tissue Tek® wurde dabei nicht von dem Gewebe getrennt und es folgte eine Aufarbeitung gemäß dem Protokoll des Kits.

Erwartungsgemäß sollte aus Gewebe, welche nach Entfernung aus dem menschlichen Körper maximal 20 Minuten Raumtemperatur ausgesetzt ist (dies stellt die Maximaldauer einer Schnellschnittdiagnostik dar), besonders reichlich DNA zu extrahieren sein, da diese im Gegensatz zu der Aufarbeitung zu FFPE Gewebe nicht angegriffen wird.

Während der Extraktion gemäß des Protokolls des „QIAmp DNA Mini Kits“ fiel bei zufügen des Ethanols in das Mikroreaktionsgefäß Material aus, welche weiße, zähe Schlieren in der Lösung bildete. Die Durchführung wurde trotzdem protokollgerecht beendet, jedoch war die Konzentration der gewonnen DNA äußerst niedrig und gerade noch für die weiteren Schritte verwertbar.

Vermutlich ist der weiße Ausfall das zuvor nicht entfernte Tissue Tek® gewesen, welche dann bei der Extraktion die feine Membran der Extraktionsäulen verstopft hat und somit die DNA Ausbeute deutlich verringerte. Da die DNA glücklicherweise trotzdem verwertbar war, musste das Experiment nicht wiederholt werden, trotzdem ist die Entfernung des Fremdmaterials um das Gewebe ratsam, um ein Ergebnis nicht zu verfälschen.

4.1.2 Sequenzierung der DNA

Es gibt mehrere etablierte Methoden, welche zur Mutationsanalyse unter Einbeziehung des Gegenstranges eingesetzt werden. In der Sequenzierung nach Sanger erfolgt die Synthese über einen Strangabbruch (Sanger und Coulson, 1975) wogegen in der Pyrosequenzierung Lichtsignale gemessen und somit die Sequenz analysiert werden kann (siehe 2.2.4.1). Die Pyrosequenzierung erlaubt zudem eine Quantifizierung der entsprechenden Mutationen. Um unsere Ergebnisse vergleichbar mit der ursprünglichen Studie von Badalian-Very (Badalian-Very et al., 2010) zu gestalten, wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls hauptsächlich die

Pyrosequenzierung angewandt. Der BRAFStripAssay® wurde als neue, sensitive Methoden (Buxhofer-Ausch et al., 2013) in Zusammenarbeit mit dem Bundeswehr Krankenhaus Ulm in wenigen Fällen ebenfalls in die Studie mit eingeschlossen. Eine Aussage über den genauen Genotyp ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich, limitierend werden hier auch nur die häufigsten Mutationen detektiert.

In der Literatur sind neben der häufigsten *BRAFV600E* Mutation auch andere Mutationen, zum Beispiel die *V600D* Mutation, beschrieben (Kansal et al., 2013). Hier liegt ein entscheidender Vorteil der Pyrosequenzierung, welche jegliche Mutation nachweisen kann, gegenüber dem BRAFStripAssay®, welcher nur die häufigsten Mutationen erfasst. Trotzdem sind in dem Ulmer Kollektiv ausschließlich *BRAFV600E* Mutationen bestimmt worden.

Insbesondere unter dem Aspekt der Therapie mit BRAF Inhibitoren muss die Mutation einfach und eindeutig nachzuweisen sein, welches bei dem gemischtzelligem Infiltrat der LCH schwierig sein kann und in der Methodik weiterhin aktueller Forschung unterliegt (Tatsuno et al, 2016).

4.2 *BRAF* Mutationen in Non-Langerhans-Zell-Histiozytosen

In der vorliegenden Arbeit ließen sich in den Non-Langerhans-Zell-Histiozytose keine *BRAF* Mutationen nachweisen (Tabelle 1). Diese Ergebnisse decken sich, auch nach Aufschlüsselung nach histologischem Typ, bei dem Juvenilen Xanthogranulom und der Rosai-Dorfman-Erkrankung mit der Literatur (Haroche et al., 2012). Im Falle der RDD wird aktuell diskutiert, ob der *BRAF* Mutationsstatus ein Instrument zur Unterscheidung der Erkrankung von der Langerhans-Zell-Histiozytose sein kann (Dalia et al., 2014)

In der Literatur ist die Genotypisierung des follikulären Dendriten-Zell-Sarkom bisher nur in wenigen Fällen beschrieben, von welchen ca. 18% mutiert sind (Vermi et al., 2013, Go et al., 2014). In unserer Kohorte zeigte sich hier ausschließlich ein *BRAF*

Wildtyp, was angesichts der niedrigen Mutationsrate auf die Probenanzahl zurückgeführt werden könnte. Zusätzlich gibt es inzwischen Fallberichte bezüglich *BRAF* V600E mutierter Sarkomen der interdigitierenden dendritischen Zellen (O'Malley et al., 2014; Di Liso et al., 2015; O'Malley et al., 2015), sodass hier, ebenso wie bei der Langerhans-Zell-Histiozytose, inzwischen die Evaluierung alternativer Therapiestrategien mit *BRAF* Inhibitoren diskutiert bzw. angewandt wird (Di Liso et al., 2015; Wu und Pullarkat, 2016). Die Mutationsrate der Langerhans-Zell Sarkome war mit 17% deutlich höher als die der Non-Langerhans-Zell-Histiozytosen, blieb jedoch unter der Mutationshäufigkeit der LCH zurück. Der Patient, welcher an dem *BRAF*-mutierten Langerhans-Zell-Sarkom litt, ist verstorben; dies könnte ein Hinweis auf einen besonders aggressiven Verlauf sein und das Potential der Behandlung mit *BRAF* Inhibitoren, welche in einem ähnlichen Fall erfolgreich eingesetzt wurden, unterstreichen (Mourah et al., 2015).

Außer in der vorliegenden Studie gibt es keine Ergebnisse zur *BRAF* Mutationshäufigkeit bei Granularzelltumoren, welche im Ulmer Kollektiv 0% betrug. Da es sich um eine gutartige Erkrankung handelt, welche gewöhnlicherweise mit einer lokalen chirurgischen Resektion heilbar ist, scheint eine weitere Investigation zum jetzigen Zeitpunkt nur von zweitrangiger klinischer Bedeutung.

4.3 *BRAF* Mutationen in Langerhans-Zell-Histiozytosen

Wie die Metaanalyse zeigt, erreicht die Häufigkeit der *BRAF*-Mutationen bei LCH annähernd 50% (Abbildung 5). Obwohl das Analysefenster nur die Jahre 2010 bis 2014 erfasst, sind über 600 Fälle analysiert, sodass eine Mutationsfrequenz definiert werden kann, welche durch aktuelle Studien bestätigt wird (Cheng et al., 2015, Varga et al., 2015)

Innerhalb der großen Studien der Metaanalyse gleichen sich die Ergebnisse mit einer Ausnahme (Alayed et al., 2013) und liegen innerhalb des Konfidenzniveaus. In der Zusammenfassung kleiner Serien/Fallstudien wird eine etwas höhere Frequenz erreicht, was die Mutmaßung zulässt, dass insbesondere bemerkenswerte Fälle berichtet wurden. Daneben sind auch Kollektive, welche deutlich unterhalb der Mutationsfrequenz von 50% liegen beschrieben (Alayed et al., 2013) und lassen ebenfalls lediglich Spekulationen zu, zum Beispiel eine unterschiedliche ethnische Verteilung der Mutationshäufigkeit (Sasaki et al., 2016).

4.3.1 Es gibt keinen Zusammenhang zwischen dem BRAF Mutationsstatus und einem bestimmten Tumorprofil

Eine diagnostische Herausforderung stellt die Unterscheidung von lokalisierten Tumoren gegenüber Multisystemerkrankung dar (Kilpatrick et al., 1995) und die hohe Mutationsfrequenz wirft die Frage nach den Unterschieden zwischen *BRAF* mutierten und Wildtyp Läsionen auf. Zu diesem Zweck wurden Phänotyp Vergleiche (Tabelle 2) durchgeführt; jedoch wurden, mit der Ausnahme der Hautbeteiligung, keine Unterscheidungsmerkmale identifiziert, was sich mit aktuellen Beispielen der Literatur deckt (Badalian-Very et al., 2010; Berres et al., 2014; Haroche et al., 2012; Alayed et al., 2016) (nach Bubolz et al., 2014).

Aus den Ergebnissen sticht lediglich der isolierten Befall der Haut hervor, in welchem bei allen LCH Fällen das Vorhandensein von *BRAF*-Mutationen nachgewiesen werden konnten, was letztendlich jedoch statistisch nicht signifikant war.

Während in einigen Studien einen Trend beschrieben wird (Alayed et al., 2013) lieferten die vorliegenden Daten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen *BRAF*-mutierten und Wildtyp-Fällen.

4.3.2 Der diagnostische und prognostische Wert des BRAF Mutationsstatus ist limitiert

In der verfügbaren Literatur zeigt sich, dass Neoplasien mit Verbindung zu LCH (z.B. die Erdheim-Chester-Erkrankung) (Blombery et al., 2012; Haroche et al., 2013) ebenfalls *BRAF*-Mutationen aufweisen. Dennoch scheint der spezifische diagnostische Wert von *BRAF*-Mutationen in den histiozytären Erkrankungen nicht so gradlinig wie beispielsweise in der Haarzell-Leukämie mit einer Mutationsrate von annähernd 100% (Tiacchi et al., 2011). Dessen ungeachtet gibt es in jüngster Zeit Hinweise darauf, dass verschiedene Subtypen von Histiozytosen in Abhängigkeit von dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von zirkulierenden dendritischen Zellen stehen könnten, welche ihrerseits für die therapeutische Überwachung dienen könnten (Berres et al., 2014). Angesichts der jüngsten Daten zur Beschreibung somatischen Aktivierung von *ARAF* (Nelson et al., 2014) und *MAP2K1* Mutationen (Alayed et al., 2016) in der *BRAF*-Wildtyp-LCH, ist zu erwarten, dass die Einführung neuartiger Sequenzierungstechnologien weiterhin zu einer umfassenderen Eingrenzung der Mutationslandschaft bei der Langerhans-Zell-Histiozytose führen wird (nach Bubolz et al., 2014).

Allerdings gibt es derzeit zumindest in dem hier analysiertem Kollektiv keine überzeugenden Beweise, dass der *BRAF*-Status für sich einen Wert als prognostischer Biomarker darstellt (Abb 6c). Obwohl das simultane Auftreten von *BRAF* und *NRAS* Mutationen in der gleichen Läsion jedoch mit dem Patienten Outcome zusammen zu hängen scheint (Mourah et al., 2015), gelten momentan immer noch klinische Gesichtspunkte wie der Befall von kritischen Organsystemen und Therapieansprechen als prognoseentscheidend (Wu, Gao et al., 2016).

4.4 Die BRAF-Inhibitor Therapie als neuartige Behandlungsoption

Abschließend ließ sich anhand des *BRAF* Mutationsstatus nicht im Vorhinein abschätzen, ob es möglicherweise zu einem Therapieversagen kommen könnte (Abb6c), obwohl dies zwischen den verschiedenen Tumortypen möglicherweise unterschiedlich ist.

Da bereits etablierte Protokolle zur Behandlung von Langerhans-Zell-Histiozytose existieren, sollten diese folgerichtig primär weiter angewandt werden (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2016). Die Bedeutung des BRAF Inhibitors als eine Therapieoption in bis dato therapierefraktären Patienten ist inzwischen jedoch vielfach bestätigt (Gandolfi et al., 2015; Haroche et al, 2012; Charles et al, 2014; Bubolz et al., 2014), sollte aber trotzdem engster Auswahlkriterien unterliegen, da es sich weiterhin um einen Off-label Use mit teilweise schwerwiegenden, insbesondere dermalen, Nebenwirkungen handelt (Gençler und Gönül, 2016) und die längerfristigen Auswirkungen bisher noch nicht ausreichend bekannt sind. Um diese zu evaluieren wird in den USA und Kanada aktuell eine Studie (NCT01677741) für Erwachsene und Kinder mit rezidivierender Langerhans-Zell-Histiozytose durchgeführt.

Auf der Basis der Daten der vorliegenden Dissertation wurde das Therapieansprechen auf die Gabe eines BRAF Inhibitors bei einer LCH Patientin mit *BRAF* Mutation, welche auf konventionelle Behandlungsmethoden therapierefraktär war, mit zumindest teilweise metabolischer Reaktion dokumentiert (Bubolz et al., 2014) und obwohl die formalen Kriterien für eine radiologische partielle Remission (nach RECIST) nicht erfüllt waren, konnte die Progression bei dieser aggressiven Version der LCH aufgehalten werden (Abb. 3) und die Wirksamkeit von Vemurafenib über die malignen Melanome hinaus gehend bewiesen werden (Heikal et al., 2011). Allerdings ist, trotz der klassischen histologischen, immunphänotypischen und ultrastrukturellen Befunde, die alle pathognomonisch für LCH waren (Abb. 1 und Abb.

7), die klinische Präsentation und Manifestation der Krankheit sehr ähnlich -wenn nicht identisch- mit einem französischen Patienten mit Erdheim-Chester-Erkrankung, welche jedoch auch erfolgreich mit BRAF Inhibitoren behandelt werden kann (Haroche et al, 2013). Die Ähnlichkeiten der Studiendaten mit denen von Xenograft-Modellen sind beeindruckend (Sondergaard et al., 2010) und zeigen eine metabolische Funktion von mutiertem BRAF in histiozytären Neoplasien (Grabellus et al., 2012; Hall et al., 2013; Haq et al., 2013; Parmenter et al., 2014; Sheu et al., 2012; Sondergaard et al., 2010). Der stabile Erkrankungsstatus der Patientin lässt sich als einen scheinbaren Mangel an "onkogenem Schock" interpretieren (Sharma et al., 2007; Sharma et al., 2006). Aus wissenschaftlicher Perspektive wäre eine erneute Biopsie interessant gewesen; jedoch war diese klinisch, vor allem in Hinblick auf die Lage der Läsionen (z.B. Hirn) nicht indiziert (nach Bubolz et al., 2014).

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend sind *BRAF* Mutationen in histiozytären Proliferationen auf die Läsionen des Langerhans-Zell-Typs beschränkt und die Genotypisierung eines repräsentativen Kollektivs zeigt, übereinstimmend mit der Metaanalyse der Literatur, eine *BRAF*-Mutationsfrequenz etwa 50%. Auf deren Basis können allerdings keine Aussagen bezüglich eines bestimmten Tumor- bzw. Patientenprofils getroffen werden. Obwohl für die große Mehrheit der LCH-Patienten effiziente therapeutische Optionen zur Verfügung stehen, kann die Behandlung ansonsten therapierefraktärer Patienten bei *BRAF* mutierten Läsionen mit BRAF-Inhibitoren eine therapeutische Option darstellen (nach Bubolz et al., 2014).

5. Zusammenfassung

BRAF-V600E-Mutationen sind für eine wachsende Zahl von Tumoren und Leukämien von therapeutischer Relevanz, welche bei histiozytären Proliferationen, ebenso wie die Mutationsfrequenz, nicht abschließend geklärt ist. Zusammenfassend werden hier sowohl eine retrospektive Studie mit Genotypisierung von histiozytären Erkrankungen und entsprechender statistischer Auswertung sowie eine Metaanalyse der Literatur präsentiert.

Die Genotypisierung der 69 histiozytären Läsionen zeigte, dass 23 der 48 Langerhans-Zell-Histiozytosen *BRAF* V600E mutiert waren (48%), während alle Non-Langerhans-Zell-Läsionen (einschließlich des Dendriten-Zell-Sarkoms, des juvenilen Xanthogranuloms, der Rosai-Dorfman-Erkrankung und des Granularzelltumors) einen *BRAF* Wildtyp zeigten. Die Metaanalyse von 29 Publikationen zeigte bei einer Anzahl von 653 Fällen eine Gesamtmutationsfrequenz von 48,5% und ist auf dieser Grundlage als valide definiert einzuordnen. Der *BRAF*-Mutationsstatus kann auf dem Boden klinischer Parameter nicht vorhergesagt werden, ebenso wenig ist das Outcome der Patienten vorhersagbar. Trotzdem hat das Vorkommen einer *BRAF* Mutation einen therapeutischen Wert, da im Falle eines Versagens der etablierten Therapieprotokolle bei aggressiven und therapierefraktären, systemischen, *BRAF*-mutierten Erkrankungen eine Behandlung mit einem *BRAF* Inhibitor eine Therapieoption darstellen kann.

Abschließend beschränken sich *BRAF*-Mutationen in histiozytären Tumoren auf Läsionen des Langerhans-Zell-Typs und können weder über Lokalisation noch Therapieansprechen oder Outcome Informationen bereitstellen. Obwohl für die meisten LCH-Patienten effiziente Therapien zur Verfügung stehen, können Patienten mit *BRAF*-Mutationen von der Therapie mit dem *BRAF*-Inhibitor Vemurafenib profitieren (gesamte Zusammenfassung nach Bubolz et al., 2014).

6. Literaturverzeichnis

1. Abala O, Weitzman S: Treatment of Langerhans cell histiocytosis: role of BRAF/MAPK inhibition. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2015:565-570 (2015)
2. Alayed K, Medeiros LJ, Patel KP, Zuo Z, Li S, Verma S, Galbincea J, Cason RC, Luthra R, Yin CC: BRAF and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis: a study of 50 cases. Hum Pathol (2016) [Epub ahead of print]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980021>
3. Alayed K, Patel K, Zuo Z, Verma S, Cason R, Galbincea J, Luthra R, Medeiros L, Yin C: BRAF Mutation Occurs More Frequently in Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis and in Younger Patients. J Mol Diagn 15:858-859 (2013)
4. Arceci RJ, Allen CE, Dunkel I, Jacobsen ED, Whitlock J, Vassallo R, Borrello IM, Oliff A, Morris SR, Reedy BAM, Portnoy A, Smith DA, Noble B, Murnane AA, Szabo SA, Rodriguez-Galindo C, Heaney ML, McClain KL, Vaseilbuh S: Evaluation Of Afuresertib, An Oral Pan-AKT Inhibitor, In Patients With Langerhans Cell Histiocytosis. Blood 122:2907-2907 (2013)
5. Aricò M: Langerhans cell histiocytosis in children: from the bench to bedside for an updated therapy. Br J Haematol (2016) [Epub ahead of print]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26913480>
6. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, Kuo FC, Ligon AH, Stevenson KE, Kehoe SM, Garraway LA, Hahn WC, Meyerson M, Fleming MD, Rollins BJ: Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. Blood 116:1919-1923 (2010)

7. Bates SV, Lakshmanan A, Green AL, Terry J, Badalian-Very G, Rollins BJ, Fleck P, Aslam M, Degar BA: BRAF V600E-Positive Multisite Langerhans Cell Histiocytosis in a Preterm Neonate. *AJP Rep* 3:63-66 (2013)
8. Ben-Ezra J, Bailey A, Azumi N, Delsol G, Stroup R, Sheibani K, Rappaport H: Malignant histiocytosis X. A distinct clinicopathologic entity. *Cancer* 68:1050-1060 (1991)
9. Berres ML, Lim KP, Peters T, Price J, Takizawa H, Salmon H, Idoyaga J, Ruzo A, Lupo PJ, Hicks MJ, Shih A, Simko SJ, Abhyankar H, Chakraborty R, Leboeuf M, Beltrao M, Lira SA, Heym KM, Bigley V, Collin M, Manz MG, McClain K, Merad M, Allen CE: BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med* 211:669-683 (2014)
10. Berres ML, Merad M, Allen CE: Progress in understanding the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis: back to Histiocytosis X? *Br J Haematol* 169:3-13 (2015)
11. Blombery P, Wong SQ, Lade S, Prince HM: Erdheim-Chester disease harboring the BRAF V600E mutation. *J Clin Oncol* 18:338–341 (2012)
12. Bubolz AM, Weissinger SE, Stenzinger A, Arndt A, Steinestel K, Brüderlein S, Cario H, Lubatschowski A, Welke C, Anagnostopoulos I, Barth TF, Beer AJ, Möller P, Gottstein M, Viardot A, Lennerz JK: Potential clinical implications of BRAF mutations in histiocytic proliferations. *Oncotarget* 5:4060-4070 (2014)
13. Buxhofer-Ausch V, Ausch C, Zeillinger R, Oberkanins C, Dandachi N, Reiner-Concin A, Kriegshäuser G: Duplex reverse-hybridization assay for the

- simultaneous detection of KRAS/BRAF mutations in FFPE-extracted genomic DNA from colorectal cancer specimens. *Dis Markers* 34:171-177 (2013)
14. Charles J, Beani JC, Fiandrino G, Busser B: Major response to vemurafenib in patient with severe cutaneous Langerhans cell histiocytosis harboring BRAF V600E mutation. *J Am Acad Dermatol* 71:e97-e99 (2014)
15. Cheng XY, Li Y, Zhou J, Shu YG, Li XL, Fu B: [BRAF V600E Mutation in Chinese Patients with Langerhans Cell Histiocytosis and Its Clinical Significance] *Originalpublikation auf Chinesisch. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 23:526-532 (2015).
16. Chikwava K, Jaffe R: Langerin (CD207) staining in normal pediatric tissues, reactive lymph nodes, and childhood histiocytic disorders. *Pediatr Dev Pathol* 7: 607–614 (2004)
17. Chilosi M, Facchetti F, Calio A, Zamo A, Brunelli M, Martignoni G, Rossi A, Montagna L, Piccoli P, Dubini A, Tironi A, Tomassetti S, Poletti V, Doglioni C: Oncogene-induced senescence distinguishes indolent from aggressive forms of pulmonary and non-pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Leuk Lymphoma* 55:2620-2626 (2014)
18. Chu T, D'Angio GJ, Favara BE, Ladisch S, Nesbit M, Pritchard J: Histiocytosis syndromes in children. *Lancet* 2:41-42 (1987)
19. Cline MJ: Histiocytes and histiocytosis. *Blood* 84:2840-2853 (1994)
20. Cline MJ: *The White Cell*. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts London, S. 459 (1975)

21. Cutler RE Jr, Stephens RM, Saracino MR, Morrison DK: Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9214-9219 (1998)
22. Dalia S, Sagatys E, Sokol L, Kubal T: Rosai-Dorfman disease: tumor biology, clinical features, pathology, and treatment. *Cancer Control* 2:322-327 (2014)
23. Dao BD, Lingvay I, Sailors J, Landay M, Shapiro G: First-Line Use of Vemurafenib to Enable Thyroidectomy and Radioactive Iodine Ablation for BRAF-Positive Metastatic Papillary Thyroid Carcinoma: A Case Report. *J Investig Med High Impact Case Rep* 3:2324709615603723 (2015)
24. Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR: The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 19:474-480 (1994)
25. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, 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 BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954 (2002)
26. Di Liso E, Pennelli N, Lodovichetti G, Ghiotto C, Dei Tos AP, Conte P, Bonanno L: Braf mutation in interdigitating dendritic cell sarcoma: a case report and review of the literature: *Cancer Biol Ther* 16:1128-1135 (2015)

27. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T: BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 366:2038-2040 (2012)

28. Ducassou S, Seyrig F, Thomas C, Lambilliotte A, Marec-Berard P, Berger C, Plat G, Brugiere L, Ouache M, Barkaoui M, Armari-Alla C, Lutz P, Leverger G, Rialland X, Mansuy L, Pacquement H, Jeziorski E, Gandemer V, Chalard F, Chateil JF, Tazi A, Emile JF, Donadieu J: Thymus and mediastinal node involvement in childhood Langerhans cell histiocytosis: long-term follow-up from the French national cohort. *Pediatr Blood Cancer* 60:1759-1765 (2013)

29. Eychène A, Barnier JV, Apiou F, Dutrillaux B, Calothy G: Chromosomal assignment of two human B-raf(Rmil) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94Braf/Rmil and B-raf-2, a processed pseudogene. *Oncogene* 7:1657-1660, (1992)

30. Fu B, Wang Z, Li X, Wang SA, Zuo Z: Detection of BRAF V600E Mutation in Langerhans Cell Histiocytosis Using High-resolution Melting Analysis in Decalcified, Paraffin-embedded Tissue. *J Leuk* 1:101 (2013)

31. Gandolfi L, Adamo S, Pileri A, Broccoli A, Argnani L, Zinzani PL: Multisystemic and Multiresistant Langerhans Cell Histiocytosis: A Case Treated With BRAF Inhibitor. *J Natl Compr Canc Netw* 13:715-718 (2015)

32. Gençler B, Gönül M: Cutaneous Side Effects of BRAF Inhibitors in Advanced Melanoma: Review of the Literature. *Dermatol Res Pract* 2016:5361569 (2016)

33. Go H, Jeon YK, Huh J, Choi SJ, Choi YD, Cha HJ, Kim HJ, Park G, Min S, Kim JE: Frequent detection of BRAF(V600E) mutations in histiocytic and dendritic cell neoplasms. *Histopathology* 65:261-272 (2014)

34. Grabelius F, Worm K, Schmid KW, Sheu SY: The BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma is associated with glucose transporter 1 overexpression. *Thyroid* 22:377-382 (2012)

35. Halfacre JA, Gale JM, Vasef MA: Analysis of BRAF V600E Mutation in Langerhans Cell Histiocytosis Using Pyrosequencing Technology. *J Mol Diagn* 14:660 (2012)

36. Hall A, Meyle KD, Lange MK, Klima M, Sanderhoff M, Dahl C, Abildgaard C, Thorup K, Moghimi SM, Jensen PB, Bartek J, Guldberg P, Christensen C: Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the (V600E)BRAF oncogene. *Oncotarget* 4:584-599 (2013)

37. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, Frederick DT, Hurley AD, Nellore A, Kung AL, Wargo JA, Song JS, Fisher DE, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell* 23:302–315 (2013)

38. Haroche J, Charlotte F, Arnaud L, von Deimling A, Helias-Rodzewicz Z, Hervier B, Cohen-Aubart F, Launay D, Lesot A, Mokhtari K, Canioni D, Galmiche L, Rose C, Schmalzing M, Croockewit S, Kambouchner M, Copin MC, Fraitag S, Sahm F, Brousse N, Amoura Z, Donadieu J, Emile JF: High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood* 120:2700-2703 (2012)

39. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, Arnaud L, Maksud P, Charlotte F, Cluzel P, Drier A, Hervier B, Benameur N, Besnard S, Donadieu J, Amoura Z: Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester

- disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation. *Blood* 121:1495-1500 (2013)
40. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, Maksud P, Drier A, Tolédano D, Barete S, Charlotte F, Cluzel P, Donadieu J, Benameur N, Grenier PA, Besnard S, Ory JP, Lifermann F, Idbaih A, Granel B, Graffin B, Hervier B, Arnaud L, Amoura Z: Reproducible and sustained efficacy of targeted therapy with vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-mutated Erdheim-Chester disease. *J Clin Oncol* 33:411-418 (2015)
41. Heakal Y, Kester M, Savage S: Vemurafenib (PLX4032): an orally available inhibitor of mutated BRAF for the treatment of metastatic melanoma. *Ann Pharmacother* 45:1399-1405 (2011)
42. Hoeflich KP, 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 LS, Belvin M: 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 Res* 69:3042-3051 (2009)
43. Howarth DM, Gilchrist GS, Mullan BP, Wiseman GA, Edmonson JH, Schomberg PJ: Langerhans cell histiocytosis: diagnosis, natural history, management, and outcome. *Cancer* 85:2278-2290 (1999)
44. Isaacson P, Jones DB, Sworn MJ, Wright DH: Malignant histiocytosis of the intestine: report of three cases with immunological and cytochemical analysis. *J Clin Pathol* 35:510-516 (1982)

45. Janku F, Amin HM, Yang D, Garrido-Laguna I, Trent JC, Kurzrock R: Response of histiocytoses to imatinib mesylate: fire to ashes. *J Clin Oncol* 28:e633-e636 (2010)
46. Kamionek M, Ahmadi Moghaddam P, Sakhdari A, Kovach AE, Welch M, Meng X, Dresser K, Tomaszewicz K, Dresser K, Cosar EF, Mark EJ, Fraire AE, Hutchinson L: Mutually exclusive ERK Pathway Mutations are present in different stages of multifocal Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis supporting clonal nature of the disease. *Histopathology* (2016) [Epub ahead of print]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26915300>
47. Kamionek M, Welch M, Tomaszewicz K, Hutchinson L, Cosar EF, Dresser K, Fraire AE: BRAF Mutation Analysis in Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis. *Mod Pathol* 25:479A (2012)
48. Kansal R, Quintanilla-Martinez L, Datta V, Lopategui J, Garshfield G, Nathwani BN: Identification of the V600D mutation in Exon 15 of the BRAF oncogene in congenital, benign langerhans cell histiocytosis. *Genes Chromosomes Cancer* 52:99-106 (2013)
49. Kilpatrick SE, Wenger DE, Gilchrist GS, Shives TC, Wollan PC, Unni KK: Langerhans' cell histiocytosis (histiocytosis X) of bone. A clinicopathologic analysis of 263 pediatric and adult cases. *Cancer* 76:2471-2484 (1995)
50. Larkin J, Del Vecchio M, Ascierto PA, Krajsova I, Schachter J, Neyns B, Espinosa E, Garbe C, Sileni VC, Gogas H, Miller WH, Jr., Mandalá M, Hospers GA, Arance A, Queirolo P, Hauschild A, Brown MP, Mitchell L, Veronese L, Blank CU: Vemurafenib in patients with BRAF mutated metastatic melanoma: an open-label, multicentre, safety study. *Lancet Oncol.* 15:436-444 (2014)

51. Lau SK, Chu PG, Weiss LM: Immunohistochemical expression of Langerin in Langerhans cell histiocytosis and non-Langerhans cell histiocytic disorders. *Am J Surg Pathol* 32:615–619 (2008)
52. Lichtenstein L: Histiocytosis X: Integration of eosinophilic granuloma of bone, Letterer-Siwe disease and Schüller-Christian disease as related manifestations of a single nosologic entity. *AMA Arch Pathol* 56:84-102 (1953)
53. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M: Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 46:249-279 (2006)
54. Milne P, Bigley V, McGovern N, Collin M: Revisiting the origin of Langerhans cell histiocytosis: mutated BRAF gene identifies potential circulating precursor cells. In: SCIENTIFIC PROGRAM & ABSTRACTS, 13th International workshop on Langerhans Cells October 10-13, 2013, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, S.82 (2013)
[http://www.lc2013.nl/LC2013%20--%20Abstract%20Book%20\(FINAL\).pdf](http://www.lc2013.nl/LC2013%20--%20Abstract%20Book%20(FINAL).pdf)
55. Mitchell JM, Terrano D, Lee J, Alobeid B, Bhagat G, Mansukhani M, Remotti H: BRAF V600E Mutation in Langerhans Cell Histiocytosis of the Liver. *Arch Pathol Lab Med* 136:1024 (2012)
56. Montella L, Insabato L, Palmieri G: Imatinib mesylate for cerebral Langerhans'-cell histiocytosis. *N Engl J Med* 351:1034-1035 (2004)

57. Mourah S, Lorillon G, Meignin V, Vercellino L, de Margerie-Mellon C, Pages C, Goldwirt L, How-Kit A, Tost J, Lebbe C, Tazi A: Dramatic transient improvement of metastatic BRAF(V600E)-mutated Langerhans cell sarcoma under treatment with dabrafenib. *Blood* 126:2649-2652 (2015)
58. Nauert C, Zornoza J, Ayala A, Harle TS: Eosinophilic granuloma of bone: diagnosis and management. *Skeletal Radiol* 10:227-235 (1983)
59. Nelson DS, Quispel W, Badalian-Very G, van Halteren AG, van den Bos C, Bovee JV, Tian SY, Van Hummelen P, Ducar M, Macconail LE, Egeler RM, Rollins BJ: Somatic activating ARAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 123:3152-3155 (2014)
60. Nezelof C, Basset F: Langerhans cell histiocytosis research. Past, present, and future. *Hematol Oncol Clin North Am* 12:385-406 (1998)
61. Oishi N, Kondo T, Mochizuki K, Inoue T, Kasai K, Nakazawa T, Mitsumori T, Katoh R: Localized Langerhans cell histiocytosis of the thymus with BRAF V600E mutation: a case report with immunohistochemical and genetic analyses. *Hum Pathol* 45:1302-1305 (2014)
62. O'Malley DP, Agrawal R, Grimm KE, Hummel J, Glazyrin A, Dim DC, Madhusudhana S, Weiss LM: Evidence of BRAF V600E in indeterminate cell tumor and interdigitating dendritic cell sarcoma. *Ann Diagn Pathol* 19:113-116 (2015)
63. O'Malley DP, Kim YS, Vergilio JA, Chen ZW, Weiss LM: BRAF V600E Mutation Specific Immunohistochemistry Is a Rare Finding in Dendritic Cell- and Histiocyte-Derived Tumors. *Mod Pathol* 27:366A (2014)

64. Ordóñez NG, Mackay B: Granular cell tumor: a review of the pathology and histogenesis. *Ultrastruct Pathol* 23:207-222 (1999)
65. Orfanos CE, Lämmer D: Retikulohistiozytäre Tumore der Haut. *Hautarzt* 31:297-307 (1980)
66. Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, Hampel HL, Thibodeau SN: EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med* 11:42-65 (2009)
67. Parmenter TJ, Kleinschmidt M, Kinross KM, Bond ST, Li J, Kaadige MR, Rao A, Sheppard KE, Hugo W, Pupo GM, Pearson RB, McGee SL, Long GV, Scolyer RA, Rizos H, Lo RS, Cullinane C, Ayer DE, Ribas A, Johnstone RW, Hicks RJ, McArthur GA: Response of BRAF-Mutant Melanoma to BRAF Inhibition Is Mediated by a Network of Transcriptional Regulators of Glycolysis. *Cancer Discov* 4:423-433 (2014)
68. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board: Langerhans Cell Histiocytosis Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries [Internet] (2016)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65799/>
69. Peters TL, Price J, George R, Lim PH, Heym KM, Merad M, McClain KL, Allen CE: Frequent BRAF V600E Mutations Are Identified in CD207+ Cells in LCH Lesions, but BRAF Status does not Correlate with Clinical Presentation of Patients or Transcriptional Profiles of CD207+ Cells. *Blood* 118:1372 (2011)
70. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, Banks P, Campo E, Chan JK, Favera RD, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gascoyne RD, Gaulard P, Gatter KC, Isaacson

- PG, Jaffe ES, Kluin P, Knowles DM, Mason DY, Mori S, Muller-Hermelink HK, Piris MA, Ralfkiaer E, Stein H, Su IJ, Warnke RA, Weiss LM: Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. *Histopathology* 41:1-29 (2002)
71. Protsenko SA, Semionova AI, Komarov YI, Aleksakhina SN, Ivantsov AO, Iyevleva AG, Imyanitov EN: BRAF-mutated clear cell sarcoma is sensitive to vemurafenib treatment. *Invest New Drugs* 33:1136-1143 (2015)
72. Roberts A, Allanson J, Jadico SK, Kavamura MI, Noonan J, Opitz JM, Young T, Neri G: The cardiofaciocutaneous syndrome. *J Med Genet* 43:833-842 (2006)
73. Roden AC, Hu X, Kip S, Parrilla Castellar ER, Rumilla KM, Vrana JA, Vassallo R, Ryu JH, Yi ES: BRAF V600E Expression in Langerhans Cell Histiocytosis: Clinical and Immunohistochemical Study on 25 Pulmonary and 54 Extrapulmonary Cases. *Am J Surg Pathol* 38:548-551 (2014)
74. Romano RC, Shon W, Fritche KL: BRAF V600E Immunohistochemistry in Cutaneous Langerhans Cell Histiocytosis. *Mod Pathol* 27:142A (2014)
75. Sahm F, Capper D, Preusser M, Meyer J, Stenzinger A, Lasitschka F, Berghoff AS, Habel A, Schneider M, Kulozik A, Anagnostopoulos I, Mullauer L, Mechttersheimer G, von Deimling A: BRAFV600E mutant protein is expressed in cells of variable maturation in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 120:e28-e34 (2012)
76. Sanger F, Coulson A.R: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94:441-448 (1975)

77. Sasaki Y, Guo Y, Arakawa F, Miyoshi H, Yoshida N, Koga Y, Nakashima K, Kurita D, Niino D, Seto M, Ohshima K: Analysis of the BRAFV600E mutation in 19 cases of Langerhans cell histiocytosis in Japan. *Hematol Oncol* (2016) [Epub ahead of print]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27041734>

78. Satoh T, Smith A, Sarde A, Lu HC, Mian S, Trouillet C, Mufti G, Emile JF, Fraternali F, Donadieu J, Geissmann F: B-RAF mutant alleles associated with Langerhans cell histiocytosis, a granulomatous pediatric disease. *PLoS One* 7:e33891 (2012)

79. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7:169-181 (2007)

80. Sharma SV, Fischbach MA, Haber DA, Settleman J: "Oncogenic shock": explaining oncogene addiction through differential signal attenuation. *Clin Cancer Res* 12:4392s-4395s (2006)

81. Sheu JJ, Guan B, Tsai FJ, Hsiao EY, Chen CM, Seruca R, Wang TL, Shih Ie M: Mutant BRAF induces DNA strand breaks, activates DNA damage response pathway, and up-regulates glucose transporter-1 in nontransformed epithelial cells. *Am J Pathol* 180:1179-1188 (2012)

82. Sondergaard JN, Nazarian R, Wang Q, Guo D, Hsueh T, Mok S, Sazegar H, MacConaill LE, Barretina JG, Kehoe SM, Attar N, von Euw E, Zuckerman JE, Chmielowski B, Comin-Anduix B, Koya RC, Mischel PS, Lo RS, Ribas A: Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 8:39 (2010)

83. Sun F, Sun X, Zhen Z, Zhu J: Case report: Response to BRAF V600E Inhibitor Vemurafenib and Adoptive Immunotherapy in a Patient with Multisystemic and Refractory Langerhans Cell Histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 60:S152 (2013)
84. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon, S. 354 (2008 a)
85. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon, S. 358 (2008 b)
86. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon, S.356-367 (2008 c)
87. Tatsuno M, Shioda Y, Iwafuchi H, Yamazaki S, Iijima K, Takahashi C, Ono H, Uchida K, Okamura O, Matubayashi M, Okuyama T, Matsumoto K, Yoshioka T, Nakazawa A: BRAF V600 mutations in Langerhans cell histiocytosis with a simple and unique assay. *Diagn Pathol* 11:39 (2016)
88. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, Pucciarini A, Bigerna B, Pacini R, Wells VA, 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, Foa R, Farinelli L, Haferlach T, Pasqualucci L, Rabadan R, Falini B: BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 364:2305-2315 (2011)

89. Varga E, Korom I, Polyánka H, Szabó K, Széll M, Baltás E, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Oláh J: BRAFV600E mutation in cutaneous lesions of patients with adult Langerhans cell histiocytosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29:1205-1211 (2015)
90. Vermi W, Giurisato E, Lonardi S, Balzarini P, Rossi E, Medicina D, Bosisio D, Sozzani S, Pellegrini W, Doglioni C, Marchetti A, Rossi G, Pileri S, Facchetti F: Ligand-dependent activation of EGFR in follicular dendritic cells sarcoma is sustained by local production of cognate ligands. *Clin Cancer Res* 19:5027-5038 (2013)
91. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116:855-867 (2004)
92. Wei R, Wang Z, Li X, Shu Y, Fu B: Frequent BRAF V600E mutation has no effect on tumor invasiveness in patients with Langerhans cell histiocytosis. *Biomed Rep* 1:365-368 (2013)
93. Wellbrock C, Hurlstone A: BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol* 80:561-567 (2010)
94. West DS, Dogan A, Quint PS, Tricker-Klar ML, Porcher JC, Ketterling RP, Law ME, McPhail ED, Viswanatha DS, Kurtin PJ, Dao LN, Ritzer RD, Nowakowski GS, Feldman AL: Clonally related follicular lymphomas and Langerhans cell neoplasms: expanding the spectrum of transdifferentiation. *Am J Surg Pathol* 37:978-986 (2013)

95. Willis B, Ablin A, Weinberg V, Zoger S, Wara WM, Matthay KK: Disease course and late sequelae of Langerhans' cell histiocytosis: 25-year experience at the University of California, San Francisco. *J Clin Oncol* 14:2073-2082 (1996)
96. Wiseman BK: The origin of the white blood cell. *J Am Med Assoc* 103:1524-1529 (1934)
97. Wong KK: Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 4:28-35 (2009)
98. Wu A, Pullarkat S: Follicular Dendritic Cell Sarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 140:186-190 (2016)
99. Wu FF, Gao YJ, Pan C, Chen J, Tang JY: [Clinical study of 131 children with multi-system Langerhans cell histiocytosis] *Originalpublikation auf Chinesisch. Zhonghua Er Ke Za Zhi* 54:349-353 (2016)
100. Yoon JH, Park HJ, Park SY, Park BK: Langerhans cell histiocytosis in non-twin siblings. *Pediatr Int* 55:e73-e76 (2013)
101. Yousem SA, Dacic S, Nikiforov YE, Nikiforova M: Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: profiling of multifocal tumors using next-generation sequencing identifies concordant occurrence of BRAF V600E mutations. *Chest* 143:1679-1684 (2013)
102. Yuan J, Caponetti GC, Lytle D, Greiner TC: Detection of BRAF V600E Mutations in Langerhans Cell Histiocytosis by Pyrosequencing. *Mod Pathol* 26:369A (2013)

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater und Direktor des Instituts für Pathologie der Universität Ulm, Prof. Dr. med. Peter Möller, danken. Er hat sich sehr für dieses Projekt eingesetzt und stellte nicht nur seine Zeit und Beratung, sondern auch die nötigen Ressourcen zur Verfügung.

Als nächstes möchte ich meinem Betreuer, PD Dr. med. Jochen Lennerz für seine konstante Hilfe, Kreativität, Geduld und Unterstützung danken.

Nicht zu vergessen sind die am Institut für Pathologie angestellten Damen, denen ich ebenfalls Dank schulde: Dr. Ulrike Kostezka, Elena Moser, Julia Kiedaisch und Iwona Nerbas für ihre fachkundige Unterstützung und Beratung. Außerdem danke ich allen, die zu dem Projekt beigetragen haben: PD Andreas Viardot, Prof. Thomas FE Barth, Dr. Silke Brüderlein, Prof. Holger Cario und Anneli Lubatschowski (Universität Ulm), Dr. Albrecht Stenzinger (Universität Heidelberg) und Prof. Ioannis Anagnostopoulos (Charité Berlin) für Ihre Hilfe bei der Auswahl der Fälle, Peter Kuhn und Claudia Welke aus dem Comprehensive Cancer Center Ulm und Werner Kugler (Institut für Pathologie) für die administrative Unterstützung, außerdem Prof. Ambros J. Beer und Dr. Martin Gottstein (Universität Ulm, Abteilung für Nuklearmedizin), die die PET-CT-Scans und SUV-Berechnungen durchgeführt haben, Dr. Annette Arndt und Dr. Konrad Steinestel (beide Bundeswehrkrankenhaus Ulm) und Dr. Uwe Gerstenmaier (Varionostics, Ulm), die bei der Genotypisierung geholfen haben und Renate Kunz für kompetente technische Hilfe bei der Elektronenmikroskopie. Schließlich möchte ich mich bei meiner Co-Doktorandin Dr. Stephanie E. Weissinger (Universität Ulm) für ihren Rat und für die Hilfe bei der Durchführung der Elektronenmikroskopie bedanken.

Abschließend danke ich meinen Eltern, Fritz und Martin und allen meinen Freunden, deren Liebe und Unterstützung ein Geschenk ist, das ich nie vergessen werde.

**Curriculum vitae
Anna-Maria Bubolz**

- Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt-

PUBLIKATIONEN

Anna-Maria Bubolz, Stephanie E. Weissinger, Albrecht Stenzinger, Annette Arndt, Konrad Steinestel, Silke Brüderlein, Holger Cario, Anneli Lubatschowski, Claudia Welke, Ioannis Anagnostopoulos, Thomas F. E. Barth, Ambros J. Beer, Peter Möller, Martin Gottstein, Andreas Viardot, Jochen K. Lennerz: *Potential Clinical Implications of BRAF Mutations in Histiocytic Proliferations*. **Oncotarget 5: 4060–4070 (2014)**

Jochen Lennerz, Karl Hoffmann, **Anna-Maria Bubolz**, Davor Lessel, Claudia Welke, Nele Ruether, Andreas Viardot, Peter Möller: *Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene Mutation Status as a Prognostic Biomarker in Classical Hodgkin Lymphoma*. **Oncotarget 6:29097-29110 (2015)**

PRÄSENTATIONEN

Heidelberg 2013: Anna-Maria Bubolz, Peter Möller, Jochen K Lennerz „Der *BRAF* V600E Mutationsstatus erlaubt keine diagnostische Unterscheidung von pulmonalen und systemischen Histiozytosen“, 97. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Heidelberg Germany, 23. – 26 Mai 2013. **(Poster)**

POSTER

Frankfurt 2015: Bruno Märkl, Jochen Hardt, Stefan Rüth, Katharina Endhardt, **Anna-Maria Bubolz**, Regina Ihringer, Matthias Anthuber, Reinhard Hoffmann: *uPA- and PAI1- levels are increased in locally advanced, high grade and nodal positive colorectal cancers*, 99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Frankfurt am Main Germany, 28. – 31 Mai 2015. **(Poster)**