

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Immunhistochemische und molekulare Charakterisierung von Langerhanszell-Histiozytosen im Kindesalter

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Svea Rebecka Monsees
aus Bremervörde
Kiel 2019

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Ilske Oschlies
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Denis Schewe
Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.04.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Langerhanszell-Histiozytose	1
1.2 Einteilung.....	2
1.3 Diagnostik und histopathologische Merkmale.....	4
1.4 Therapie	5
1.5 Prognose und Spätfolgen	7
1.5.1 Prognose	7
1.5.2 Spätfolgen.....	7
1.6 Ätiologie der Langerhanszell-Histiozytose.....	9
1.6.1 RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweg.....	10
1.6.2 <i>BRAFV600E</i> -Mutationen bei der Langerhanszell-Histiozytose	11
1.6.3 <i>MAP2K1</i> -Mutationen bei der Langerhanszell-Histiozytose	12
1.6.4 Die Anaplastische Lymphomkinase bei der Langerhanszell-Histiozytose	12
1.6.5 IL-17A bei der Langerhanszell-Histiozytose	13
1.6.6 PD-L1 bei der Langerhanszell-Histiozytose	13
1.6.7 SH-PTP1 bei Langerhanszell-Histiozytose	14
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	14
2 Untersuchungsgut und Methoden.....	16
2.1 Untersuchungsmaterial	16
2.1.1 Histopathologisches Review	16
2.2 Anfertigen von Tissue Microarrays	17
2.2.1 Schnitthanfertigung der TMA	17
2.3 Immunhistochemische Färbungen.....	18
2.3.1 Gewebepreparierung.....	19
2.3.2 Immunohistochemische Färbung nach Histofine®	19
2.3.3 Materialienliste für die Arbeitsschritte in Kapitel 2.3.....	20
2.4 Molekulare Analyse zum <i>MAP2K1</i> -Mutationsstatus	21
2.4.1 DNA-Isolierung	21
2.4.2 DNA-Messung am Nanodrop.....	22
2.4.3 <i>MAP2K1</i> -PCR	22
2.4.4 Agarose- Gelelektrophorese	24
2.4.5 PCR-Produkt-Aufreinigung.....	24
2.4.6 Erneute DNA-Messung am Nanodrop.....	24

2.4.7	DNA-Sequenzierung.....	25
2.4.8	Aufreinigung der Sequenzierung.....	26
2.4.9	Auswertung am AbiPrism3500.....	26
2.4.10	Materialienliste für die Arbeitsschritte in Kapitel 2.4.....	27
2.5	Auswertung.....	29
2.5.1	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	29
2.5.2	Auswertung der molekularen <i>MAP2K1</i> -Mutationsdiagnostik.....	30
2.5.3	Statistik.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Patientenalter, Geschlechterverteilung und Ausprägung der LCH.....	32
3.2	Immunhistochemische Auswertung.....	33
3.2.1	Immunhistochemischer Langerin-Nachweis.....	33
3.2.2	Immunhistochemischer IL-17A-Nachweis.....	34
3.2.3	Immunhistochemischer SH-PTP1-Nachweis.....	35
3.2.4	Immunhistochemischer ALKD5F3-Nachweis.....	36
3.2.5	Immunhistochemischer PD-L1-Nachweis.....	36
3.2.6	Immunhistochemischer <i>BRAFV600E</i> -Nachweis.....	38
3.2.7	Molekulare Auswertung des <i>MAP2K1</i> - Mutationsstatus.....	40
3.3	Korrelation des immunhistochemischen <i>BRAF</i> -Mutationsstatus mit der klinischen Präsentation.....	42
3.3.1	Korrelation des immunhistochemischen <i>BRAF</i> -Mutationsstatus und der PD-L1-Expression.....	42
3.4	Korrelation des molekularen <i>MAP2K1</i> -Mutationsstatus mit der klinischen Präsentation.....	43
3.5	Korrelation des molekularen <i>MAP2K1</i> -Mutationsstatus mit der immunhistochemischen PD-L1 Expression.....	44
4	Diskussion.....	45
4.1	Immunhistochemische Färbungen.....	45
4.2	Mutationsauswertung.....	52
4.2.1	Molekulare <i>MAP2K1</i> -Mutationsanalyse.....	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literaturverzeichnis.....	56
7	Danksagung.....	68
8	Projektbezogene Publikationen.....	69
9	Anhang.....	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel einer LCH in Langerin- und HE-Färbung.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der intrazellulären MAPK- und ERK-Kaskade.....	10
Abbildung 3: Prinzip der immunhistochemischen Färbung nach Histiofine®.....	20
Abbildung 4: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit dem Marker IL-17A.....	34
Abbildung 5: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit dem Marker SH-PTP1.....	35
Abbildung 6: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit dem Marker ALKD5F3... ..	37
Abbildung 7: Box-Whisker- und Violin-Plot zur Altersverteilung der BRAF-Expression.....	39
Abbildung 8: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit dem Marker BRAFV600E.	39
Abbildung 9: Box-Whisker- und Violin-Plot zur Altersverteilung der MAP2K1-Mutation... ..	40
Abbildung 10: Beispiel einer MAP2K1-Mutation (c.303_308del; p.E102_I103 del im Exon3)	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Langerhanszell-Histiozytose.....	2
Tabelle 2: Special sites bei Multisystemischer-LCH.....	3
Tabelle 3: Risikoorgane bei Multisystemischer-LCH.....	3
Tabelle 4: Spätfolgen der Langerhanszell-Histiozytose.....	8
Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Antikörper.....	18
Tabelle 6: MasterMIX für die PCR mit einem 5 µl DNA-Ansatz.....	23
Tabelle 7: PyroMark PCR Kit von Qiagen für die PCR mit 5 µl DNA-Ansatz.....	23
Tabelle 8: PCR-Protokoll für die <i>MAP2K1</i> -PCR.....	23
Tabelle 9: Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion (MasterMIX).....	25
Tabelle 10: Sequenzierungs-Protokoll.....	26
Tabelle 11: Verwendete Primer-Sequenzen.....	26
Tabelle 12: Übersicht der Geschlechterverteilung im Bezug zur klinischen Präsentation.....	33
Tabelle 13: Übersicht der immunhistochemischen IL-17A-Expression.....	34
Tabelle 14: Immunhistochemische IL-17A-Expression und die klinische Präsentation.....	35
Tabelle 15: Übersicht der immunhistochemischen PD-L1 Expression.....	37
Tabelle 16: Immunhistochemische PD-L1-Expression (Klon 130021) und klinische Präsentation.....	38
Tabelle 17: Immunhistochemische PD-L1-Expression (Klon E1L3N) und klinische Präsentation.....	38
Tabelle 18: Übersicht der molekular nachgewiesenen MAP2K1-Mutationen.....	41

Tabelle 19: Tabelle 19: Immunhistochemische BRAF-Expression und klinische Präsentation	42
Tabelle 20: Immunhistochemische BRAF- und PD-L1-Expression (Klon 130021).....	42
Tabelle 21: Immunhistochemische BRAF- und PD-L1-Expression (Klon E1L3N).....	43
Tabelle 22: MAP2K1-Mutationsstatus und klinische Präsentation	43
Tabelle 23: MAP2K1-Mutationsstatus und immunhistochemische PD-L1-Expression (Klon 130021).....	44
Tabelle 24: <i>MAP2K1</i> -Mutationsstatus und immunhistochemische PD-L1-Expression (Klon E1L3N).....	44

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BRAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma
CD	Cluster of Differentiation
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DNA	deoxyribonucleic acid
CS	Firma Cell Signaling, Danvers, MA, US
DZ	dendritische Zellen
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like 4
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HE	Haematoxylin- Eosin
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
TMA	Tissue Microarray
IL	Interleukin
IMC	Immunhistochemie
KIF5B	Kinesin-1 heavy chain
LC	Langerhanszelle
LCH	Langerhanszell-Histiozytose
m	männlich
MAPK	Mitogen-Activated Protein-Kinase
MAP2K	Mitogen-Activated Protein-Kinase Kinase
MAP3K	Mitogen-Activated Protein-Kinase Kinase Kinase
MEK	= MAP2K
min	Minute(n)
mm	Millimeter
MS	Multisystemisch
NE-Puffer	Elutionspuffer
nm	Nanometer
NPM	Nucleophosmin
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PD-L1	Programmed death-ligand 1

PIER	Proteolytic Induced Epitope Retrieval
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
R+D	Firma R&D Systems, Minneapolis, MN, US
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
Sek	Sekunden
SHP	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SS	Singlesystemisch
TAE	TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
V	Volt
VBL	Vinblastin
w	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate

1 Einleitung

1.1 Die Langerhanszell-Histiozytose

Die Langerhanszell-Histiozytose (LCH) wird von der WHO als klonale neoplastische Proliferation von Langerhanszellen definiert. Die Erkrankung tritt mit einer seltenen Inzidenz von ca. fünf Fällen auf 1.000.000 Kinder innerhalb eines Jahres auf (Alston et al., 2007; Guyot-Goubin et al., 2008; Swerdlow et al., 2008). Die betroffenen Zellen weisen auf ihrer Oberfläche eine charakteristische immunhistochemische Expression von CD1a und Langerin auf. Histologisch zeigen befallene Gebiete meist 'cluster'-förmige Langerhanszellnester mit entzündlichem Infiltrat aus Lymphozyten, Riesenzellen sowie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (Vokuhl et al., 2015). Aufgrund der morphologischen Erscheinung der LCH-Zelle wurde lange vermutet, dass sich die Langerhanszelle der LCH von der dendritischen Langerhanszelle der Haut ableitet. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die LCH-Zelle als eine eigene Entität verstanden wird (Allen et al., 2010; Hutter et al., 2012). Die Zellen der LCH unterscheiden sich von den physiologischen Langerhanszellen der Haut dadurch, dass sie jedes Gewebe des Körpers infiltrieren können. Als Folge davon kann die LCH an nahezu allen Lokalisationen auftreten und jedes Organsystem befallen. Die Symptomatik der Erkrankung ist stark von dem befallenen Organ abhängig und wird häufig per Zufallsdiagnose entdeckt. Prinzipiell tritt die LCH in jedem Alter auf, dennoch zeigt sich ein gehäuftes Auftreten im Kindesalter mit vorwiegendem Befall der Haut und des Skelettsystems (Guyot-Goubin et al., 2008). Die Klinik der Erkrankung reicht von unkomplizierten Verläufen, bei denen es zur Spontanremission ohne Therapie kommen kann (Broadbent et al., 1984), bis hin zu komplizierten Verläufen mit dem Befall mehrerer Organsysteme und dem Einsatz von intensiver Chemotherapie (Minkov M., 2011). Die ungeklärte Ätiologie und deren vermutliche Korrelation mit dem Erkrankungsmaß erschweren die Erstellung von Leitlinien für die Therapie der LCH. Seit Badalin-Very et al. im Jahr 2010 erstmalig der Nachweis von Mutationen im *BRAFV600E*- Gen bei über 50 % der Patienten mit LCH gelang, wird die LCH als neoplastische Erkrankung mit starker inflammatorischer Komponente eingestuft (Badalin-Very et al., 2010; Minkov et al., 2016). Im Verlauf konnten neuere Studien bei 30-50 % der *BRAF*-Wildtypen Mutationen im *MAP2K1*- und *MAP3K1*-Gen nachweisen (Brown et al., 2014; Nelson et al., 2015).

Die Prognose der Erkrankung variiert sehr stark. Für einzelne Läsionen ist sie meist sehr gut, während der disseminierte Befall mehrerer Organsysteme nicht selten einen letalen Ausgang oder Spätfolgen wie z. B. einen Diabetes insipidus zeigt (Dunger et al.; 1989, Haupt et al., 2004).

Als Risiko für einen komplizierten Verlauf gelten nach aktuellem Forschungsstand ein Alter unter zwei Jahren (Greenberger et al., 1981), Befall sogenannter „Risikoorgane“, Organversagen (Gadner et al., 2001; Lahey, 1975) und ein schlechtes Ansprechen auf die Firstline-Therapie (Lahey M., 1975; Komp et al., 1981; Minkov et al., 2002). Bis heute konnte noch kein Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung der Erkrankung und dem Mutationsstatus nachgewiesen werden. Badalin et al. konnten jedoch ein signifikant geringeres Durchschnittsalter bei Patienten mit einer *BRAF*-Mutation im Vergleich zum *BRAF*-Wildtyp belegen (Badalin et al., 2010).

1.2 Einteilung

Man unterscheidet bei dem Befallsmuster der Langerhanszell-Histiozytose zum einen die Monosystemische Erkrankung (Single System LCH; SS-LCH) mit uni- und multifokalem Befall eines Organsystems (s. Tabelle 1), von der Multisystemischen Erkrankung, bei der es zum Befall mehrerer Organsysteme kommt. Bei der MS-LCH werden noch weitere Unterteilungen in Befall von Risikoorganen und Special sites gemacht (s. Tabelle 2). Als Risikoorgane gelten solche, die in Studien mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Vor allem das hämatopoetische System und die Leber gelten als Risikoorgane (s. Tabelle 3) (Gadner et al., 2001; Lahey, 1975). Als Special sites gelten Läsionen, die eine ungünstige funktionelle Lage haben und z. B. operativ schwer zugänglich sind oder aufgrund von Komplikationen (z. B. Diabetes insipidus) eine systemische Therapie nötig machen (s. Tabelle 2) (Haupt et al., 2004).

Monosystemischer Befall (SS-LCH)	<ul style="list-style-type: none"> • Knochen (uni- oder multifokal (> 1 Knochen)) • Haut • Lymphknoten (wenn es nicht der drainierende Lymphnoten einer anderen LCH Läsion ist) • Lungen • Hypophysen-Hypothalamus-Region oder zentrales Nervensystem • andere Organsysteme (z. B. Thymus oder Schilddrüse)
Multisystemischer Befall (MS-LCH)	<ul style="list-style-type: none"> • zwei oder mehr Organe betroffen • mit oder ohne Beteiligung von Risikoorganen oder Special sites

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Langerhanszell-Histiozytose. Quelle: GPOH: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0151_S1_Langerhanszellhistiozytose_im_Kindesalter_2013-01.pdf

Augen	<ul style="list-style-type: none"> • orbitale Beteiligung mit Proptose und Exophthalmus
Ohren	<ul style="list-style-type: none"> • Beteiligung des Hörorgans mit Otitis externa, Otitis media oder Otorrhoe
ZNS	<ul style="list-style-type: none"> • tumorös: jegliche intrazerebralen Raumforderungen (Gehirn und Meningen) • Neurodegeneration mittels MRT dokumentiert • Klinische Neurodegeneration
Knochen	<ul style="list-style-type: none"> • Kraniofasziale Knochenbeteiligung: • Läsionen im Bereich der Orbita, des Os temporale, des Mastoids, des Os sphenoidale, des Os zygomaticum, des Os ethmoidale, der Maxilla, der Nasennebenhöhlen, der Schädelgrube; mit intracranialer Weichteilkomponente • Beteiligung der Wirbelkörper mit intraspinaler Weichteilkomponente oder Läsionen im Bereich des Dens axis

Tabelle 2: Special sites bei Multisystemischer-LCH.

Tabelle in Anlehnung an die Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH), Quelle: GPOH: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0151_S1_Langerhanszellhistiozytose_im_Kindesalter_2013-01.pdf

Hämatopoetisches System	<ul style="list-style-type: none"> • Hämoglobin zwischen 10 g/dl und 7 g/dl
Milz	<ul style="list-style-type: none"> • > 3 cm unter dem Rippenbogen (Medioclavicularlinie), mittels Ultraschall verifiziert
Leber	<ul style="list-style-type: none"> • > 3 cm unter dem Rippenbogen (Medioclavicularlinie), mittels Ultraschall verifiziert

Tabelle 3: Risikoorgane bei Multisystemischer-LCH. Tabelle in Anlehnung an die Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH), Quelle(GPOH): http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0151_S1_Langerhanszellhistiozytose_im_Kindesalter_2013-01.pdf

1.3 Diagnostik und histopathologische Merkmale

Der Goldstandard zur Diagnosesicherung der Langerhanszell-Histiozytose erfolgt bei klinischem Verdacht histopathologisch bzw. immunhistologisch. In der konventionellen Mikroskopie können Läsionen aus Langerhanszellen mit entzündlichen Begleitinfiltraten beobachtet werden. Der Langerhanszell-Phänotyp wird durch mittelgroße Zellen mit eosinophilem Zytoplasma charakterisiert. Die Zellkerne sind ovoid und haben deutlich erkennbare Kernfalten. Während die Langerhanszellen der Haut zytoplasmatische Ausläufer haben, fehlen diese bei der Langerhanszell-Histiozytose bzw. können nicht eindeutig erkannt werden (Vokuhl et al., 2015).

Der 1987 festgelegte Goldstandard der Elektronenmikroskopie zum Nachweis von Birbeck Granula in den pathologischen Langerhanszellen, wurde durch die Immunhistochemie abgelöst. Da die Expression des Markers Langerin mit dem Vorkommen von Birbeck Granula korreliert, besteht die heutige immunhistologische Diagnose aus der Färbung von CD1a und Langerin (CD207), ein calcium-abhängiges Lectin, das die Bildung von Birbeck Granula induziert und zellspezifisch für die pathologische Langerhanszelle ist (s. Abbildung 1) (Valladeau et al., 2000; Bechan et al., 2006). Die typischen Langerhanszellinfiltrate besitzen sowohl den Immunphänotyp der Langerhanszelle in der Haut als auch der interdigitierenden dendritischen Zelle der T-Zellareale im Lymphknoten (Berres et al., 2015).

Aufgrund der sehr vielfältigen Klinik und verschiedenen Läsionsorte, können bildgebende Verfahren, klinische Untersuchungen und Laborwerte in der Diagnostik lediglich supportiv eingesetzt werden.

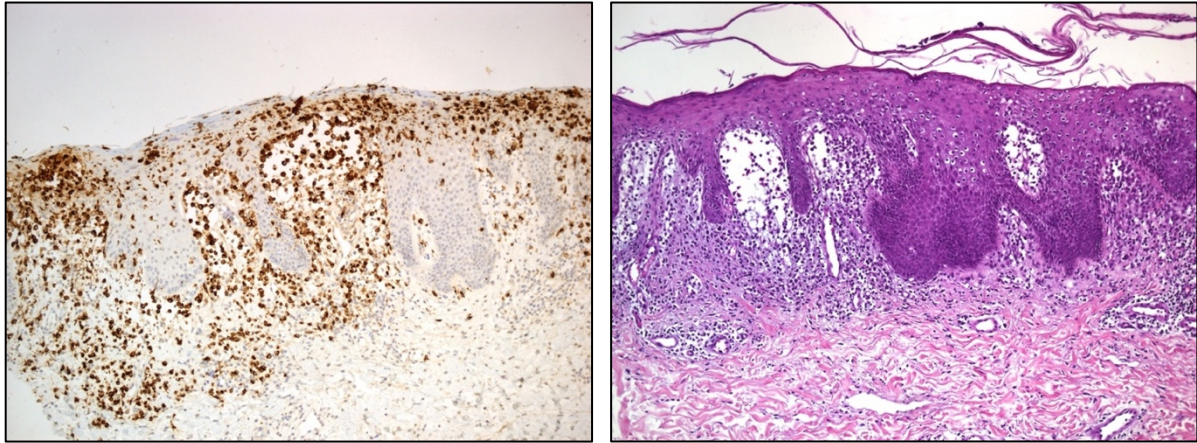


Abbildung 1: Beispiel einer LCH in Langerin- und HE-Färbung. Links: Langerinfärbung. Dermale diffuse und von einem subepithelialen Ödem begleitete Infiltration durch histiozytäre Zellen mit den typischen gefalteten Kernen bei weitem Cytoplasma. Das Infiltrat enthält beigemengte eosinophile Granulozyten. Rechts: HE-Färbung. Dermale Infiltration durch histiozytäre Zellen und entzündlichem Begleitinfiltat.

1.4 Therapie

Die Therapie der Langerhanszell-Histiozytose erfolgt nach den Leitlinien der Gemeinschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) je nach Befallsmuster und Klinik (http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/0250151_S1_Langerhanszellhistiozytose_im_Kinderalter_2013-01.pdf).

Bei monosystemischen Befall (SS-LCH) kann oft die Spontanremission als „watch and wait“-Therapie abgewartet und regelmäßige Verlaufskontrollen vorgenommen werden. Einzelne Hautläsionen können mit topischem Nitrogen Mustard behandelt werden (Sheehan et al., 1991; Hoeger et al., 2000). Mehrere randomisierte Studien seit den 1990er Jahren konnten Empfehlungen für die Therapie der multisystemischen Langerhanszell-Histiozytose herausarbeiten. Kommt es zur MS-LCH, bzw. zum monosystemischen Befall mit Beteiligung eines definierten Risikoorgans, ist die systemische Chemotherapie mit Vinblastin (VBL) indiziert. (Gadner et al., 1994; Gadner et al., 2001; Gadner et al., 2008). Dem Ansatz der inflammatorischen Komponente der Erkrankung folgend, kommen zusätzlich oft Glukosteroide zum Einsatz (McLelland et al., 1990). Da derzeit das Ansprechen auf die systemische Induktionstherapie nach sechs Wochen als der wichtigste prognostische Marker dient, sollte bei Nicht-Ansprechen auf eine „Salvage“-Therapie gewechselt werden (Gadner et al., 2001; Gadner et al.; 2008; Morimoto et al., 2006). Die Studienlage gibt für die Salvage-Therapie noch keine zuverlässige evidenzbasierte Behandlungsempfehlung her. Bernard et al. zeigten 2005 in ihrer Pilotstudie, dass mit 2-Chlorodeoxyadenosine (2-CdA) und hochdosiertem Cytarabin Ara-C bei therapierefraktären LCH ein verbessertes Überleben erreicht werden konnte und somit

als mögliche Therapieoption dient (Bernard et al., 2005; Arico, M., 2016). Die allogene Stammzelltransplantation scheint vor allem für die Patienten mit einem Versagen der Salvage-Therapie eine Rolle zu spielen. Sie weist jedoch eine hohe transplantations-bedingte Mortalität auf. Vor allem bezüglich der klassischen Konditionierung versus einer reduzierten Konditionierungsintensität vor der Stammzelltransplantation konnten noch keine eindeutigen Ergebnisse veröffentlicht werden (Caselli et Aricò, 2008; Kudo et al.; 2010, Veys et al., 2015; Aricò, M., 2016). Zu diesem Zeitpunkt gibt es noch keine ausreichende Datenlage für die Empfehlung zur allogenen Stammzelltransplantation bei therapierefraktären Langerhanszell-Histiozytosen.

Die in den letzten Jahren entdeckten Mutationen der LCH bieten neue Therapieansätze der Targeted Therapie. Haroche et al. veröffentlichten 2015 erstmalig Studienergebnisse zur Behandlung mit Vemurafenib, einem BRAF-Inhibitor. Die behandelten erwachsenen Patienten litten unter der Erdheim-Chester-Disease oder Langerhanszell-Histiozytose und zeigten ein gutes Ansprechen auf die Therapie (Haroche et al., 2013; Haroche et al., 2015). Im Jahr 2015 gab es den ersten off-label Einsatz bei einer kindlichen Langerhanszell-Histiozytose. Héritier et al. veröffentlichten den Fall eines weiblichen Säuglings mit einer therapierefraktären disseminierten, *BRAF*-positiven LCH. Nach der off-label Therapie mit dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib kam es im Verlauf zur vollständigen Remission der Erkrankung (Héritier et al., 2015; Aricò, M., 2016). Studien für die Behandlung von kindlichen LCHs mit dem BRAF-Inhibitor Dabrafenib, befinden sich jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch in Phase I/ II [NCT01677741]. Auch die seit einigen Jahren bekannte *MAP2KI*-Mutation verspricht neue Therapieansätze mit dem bereits in der Melanomtherapie etablierten MEK-Inhibitor Trametinib (Flaherty et al., 2012; Abla et Weitzmann, 2015; Aricò, M., 2016).

1.5 Prognose und Spätfolgen

1.5.1 Prognose

Als relevante prognostische Faktoren für den Verlauf der Langerhanszell-Histiozytose zeigten sich:

1. **Alter bei Diagnose:** Ein Erkrankungsalter von unter zwei Jahren zeigte sich lange als negativer prognostischer Faktor (Greenberger et al., 1981). Minkov et al. zeigten 2005 jedoch, dass nicht per se das Erkrankungsalter unter zwei Jahren als prognostischer Faktor gewertet werden kann, sondern viel mehr, dass ein Zusammenhang zwischen dem jungen Erkrankungsalter und einer disseminierten Erkrankung besteht (Minkov et al., 2005).
2. **Ansprechen auf die Firstline-Therapie:** Das Ansprechen auf die Firstline-Therapie nach sechs Wochen zeigte sich als der wichtigste positive prognostische Faktor für das Langzeitüberleben bei MS-LCH (Gadner et al., 2001).
3. **Risikoorganbefall/ Special sites:** Der Befall von Risikoorganen und Special sites (s. Tabelle 2 und 3) zeigte sich als wichtiger negativer prognostischer Faktor (Gadner et al., 2001; Lahey, 1975).

Die 5- Jahresüberlebensrate liegt für Patienten mit SS-LCH bei nahezu 100 %. Und jene für Patienten mit MS-LCH bei einem Durchschnitt von 94 % (Morimoto et al., 2006). Die Mortalität scheint vor allem mit dem Befall eines Risikoorgans zuzunehmen und vom Ansprechen auf die Firstline-Therapie abhängig zu sein. Bei MS-LCH ohne Risikoorganbeteiligung liegt die 5JÜR bei nahezu 99 %. Die Mortalität bei Patienten mit Risikoorganbefall ohne Ansprechen auf die Firstline-Therapie innerhalb von 6 oder 12 Wochen liegt jedoch derzeit bei 75 % (Abla et al., 2010, Gadner et al., 2013).

1.5.2 Spätfolgen

Bei einem insgesamt guten Langzeitüberleben, zeigen sich in bis zu 52 % der Fälle Spätfolgen der kindlichen LCH (s. Tabelle 4). Diese können erst viele Jahre nach der Diagnosestellung auftreten. Während es bei der SS-LCH nur sehr selten zu einem tödlichen Verlauf kommt, konnten dennoch häufig Spätfolgen beschrieben werden. Haupt et al. konnten 2004 bei 24 % der Patienten mit SS-LCH in den Nachsorgeuntersuchungen Langzeitfolgen feststellen. Bei MS-LCH kam es bei bis zu 71 % der Patienten zu Spätfolgen. Darunter wurden v.a. Diabetes

insipidus und orthopädische Probleme beschrieben (Haupt et al., 2004; Nanduri et al., 2006). Die GPOH empfiehlt unter Berücksichtigung der beschriebenen Spätfolgen die Verlaufskontrolle der Patienten bis ins Erwachsenenalter.

Diabetes insipidus	<ul style="list-style-type: none"> • Läsionen im Bereich des Hypophysenhinterlappen führen mit einer Inzidenz von bis zu 50 % zur häufigsten endokrinologischen Komplikation der LCH
Hormonausfälle	<ul style="list-style-type: none"> • Läsionen im Bereich des Hypophysenvorderlappen führen bei bis zu 10 % zu Wachstumshormonmangel
Orthopädische Probleme	<ul style="list-style-type: none"> • Läsionen im Bereich von Wirbelkörpern können v.a. während der Pubertät zu Skoliose führen
Gehör	<ul style="list-style-type: none"> • Läsionen im Bereich des Mittel- und Innenohres sowie des Os temporale führen in einigen Fällen zu Gehörverschlechterung und Taubheit
Mundschleimhaut/ Kiefer	<ul style="list-style-type: none"> • Läsionen im Bereich des Kiefers führen bei bis zu 37 % zu dauerhaftem Zahnverlust und machen ggf. kieferchirurgische Sanierungen nötig
Lunge	<ul style="list-style-type: none"> • Läsionen der Lunge können zur verschlechterten Lungenfunktion und -fibrose führen und machen ggf. eine Lungentransplantation nötig
Neurologische Ausfälle	<ul style="list-style-type: none"> • Multisystemische Läsionen können zu neuropsychologischen Spätfolgen wie cerebellärer Ataxie, Lernschwierigkeit und Verhaltensstörungen führen
Leber	<ul style="list-style-type: none"> • Läsionen der Leber können zur sklerosierenden Cholangitis führen und machen ggf. eine Lebertransplantation nötig (Braier et al., 2002)
Andere Malignome	<ul style="list-style-type: none"> • Es wurden einzelne Fälle von Zweitmalignomen beschrieben v.a. Akute Myeloische Leukämie

Tabelle 4: Spätfolgen der Langerhanszell-Histiozytose. Tabelle basierend auf: Nanduri et al., 2006; Haupt et. al., 2004; GPOH: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-015l_S1_Langerhanszellhistiozytose_im_Kindesalter_2013-01.pdf
EuroHistoNetGruppe:http://www.eurohistio.net/e1623/e1554/e1856/e2319/e2268/index_eng.html#literature_1

1.6 Ätiologie der Langerhanszell-Histiozytose

Bis heute konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei allen Langerhanszell-Histiozytosen um neoplastische Erkrankungen handelt oder ob ein Teil der Erkrankungen reaktiver Natur ist. Bereits 1994 wurden in einigen Untersuchungen klonale Proliferationen von Langerhanszellen nachgewiesen (Willman et al., 1994; Yu et al., 1994). Neuere Arbeiten zeigten Mutationen im *BRAF*-, *MAP2K1*- und *MAP3K1*- Gen und stützen dadurch den neoplastischen Charakter der Erkrankung (Badalin-Very et al., 2010; Brown et al., 2014; Nelson et al., 2015). Badalin-Very et al. wiesen 2010 in über 50 % der LCH-Fälle Mutationen im *BRAFV600E*-Gen nach. Da in allen LCH- Fällen unabhängig von der nachgewiesenen Mutation eine Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweges (s. Kapitel 1.6.1) gefunden wurde, wurden weitere Mutationen dieser Kaskade untersucht (Badalin-Very et al., 2010; Méhes et al., 2014). Brown et al. entdeckten bei bis zu 50 % der *BRAF*-Wildtypen Mutationen im *MAP2K1-Gen* (Brown et al., 2014). Kurze Zeit später fanden Nelson et al. bei bis zu 10 % aller untersuchten LCH eine Mutation im *MAP3K1-Gen* (Nelson et al., 2015). Auch für jene Fälle, bei denen bisher keine Mutation nachgewiesen werden konnte, liegt eine Phosphorylierung des RAS-RAF-MEK-ERK-Mapkinase Signalweges vor. Der Pathomechanismus, der der Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges zugrunde liegt, ist jedoch bis heute unbekannt. (Minkov et al., 2016).

Untersuchungen zur Überexpression der Anaplastischen Lymphomkinase bei der LCH geben weitere Hinweise auf mögliche Mutationen innerhalb der Signalkaskade (Diamond et al., 2016). Gatalica et al. beschrieben 2015 außerdem erstmalig eine Überexpression von PD-L1 (Programmed death-ligand 1) in systemischen Histiozytosen (Gatalica et al., 2015). Bei PD-L1 handelt es sich um ein immunmodulatorisches Zelloberflächenprotein, dessen Überexpression zur Tumorentstehung beiträgt. Die Unterdrückung des Zusammenspiels des PD-1 Rezeptors und Liganden durch entsprechende medikamentöse Inhibitoren, zeigte bereits bei anderen Tumoren (v.a. Melanome, Nierenzellkarzinome) erste therapeutische Erfolge (Topalian et al., 2012). Für einen Teil der Erkrankungen bleibt die Entstehungsursache jedoch weiterhin unklar. Vor allem für die klinisch unkomplizierten monosystemischen Erkrankungen, konnte die Theorie der Immundysregulation noch nicht vollständig verworfen werden.

1.6.1 RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweg

Die MAP-Kaskade (Mitogen- aktivierte Protein Kaskade) spielt eine Schlüsselrolle bei der zellulären Antwort auf extrazelluläre Signale. Der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg ist dabei eine sehr komplexe Unterform der intrazellulär verlaufenden MAPK-Kaskade (Boulton et al., 1990). Extrazelluläre Reize werden durch am Tyrosinkinase- Rezeptor bindende Liganden an intrazelluläre Komponenten übermittelt (Pawson and Scott, 1997) und regulieren so u.a. die Zellproliferation und -differenzierung (Mansour et al., 1994). Verallgemeinernd gilt für alle MAP-Kaskaden, dass es drei intrazellulär in Reihe geschaltete Kinasen gibt: MAPKKK, MAPKK und MAPK, die sich jeweils nacheinander phosphorylieren und aktivieren (s. Abbildung 2) (Ahn et al., 1993; Yoon et Seeger, 2006). Für den RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweg bedeutet das, dass die intrazellulären Kinasen in folgender Reihenfolge geschaltet sind: Raf (MAP3K), MEK (MAP2K), ERK (MAPK) (Boulton et al., 1990; Cobb et al., 1991; Crews et al., 1992; Cobb and Goldsmith, 1995). Kommt es zu einer Autophosphorylierung des Tyrosinkinase Rezeptors, wird intrazellulär das G-Protein Ras der Kaskade vorangeschaltet. Es dient vor allem dazu Raf, die erste Kinase (MAPKKK) des Signalweges, zu aktivieren (Simon et al., 1991; Jelinek et al., 1996). Für das Raf-Protein sind drei Unterformen bekannt: ARAF (Huebner et al., 1986; Huleihel et al., 1986; Mark et al., 1986; Ishikawa et al., 1987), BRAF (Ikawa et al., 1988) und CRAF (Bonner et al., 1984; Ishikawa et al., 1985; Kozak et al., 1984). Für die Langerhanszell-Histiozytose ist vor allem die Mutation im *BRAF*- Gen eine Rolle von Bedeutung (s. Kapitel 1.6.2). In weiteren komplexen Phosphorylierungsschritten werden die beiden Kinasen MEK (Kyriakis et al., 1992) und ERK aktiviert. Weit über 100 Substrate dieses Signalweges regulieren u.a. Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose und Karzinogenese (Yoon & Seger, 2006).

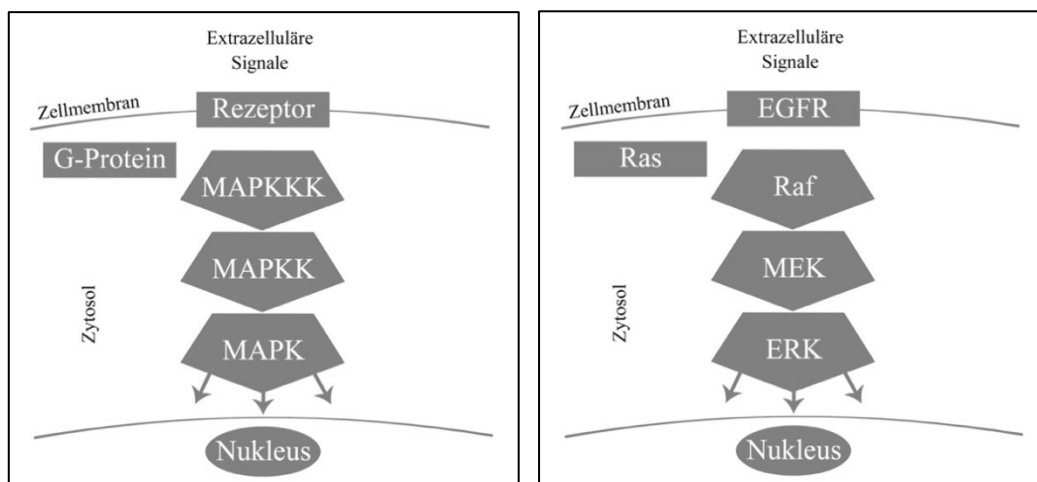


Abbildung 2: Schematische Darstellung der intrazellulären MAPK- und ERK-Kaskade. Links: Verallgemeinerter Ablauf der MAPK-Kaskade bei Aktivierung. Rechts: Ablauf der ERK-Kaskade bei Aktivierung.

1.6.2 *BRAFV600E*-Mutationen bei der Langerhanszell-Histiozytose

BRAF (B-rapidly accelerated fibrosarcoma) ist ein Protoonkogen, das für die Serin/Threonin-Protein Kinase B-Raf kodiert und dadurch u.a. die Zellteilung und -differenzierung reguliert. Das Protein B-Raf ist Bestandteil des RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweges (Ikawa et al., 1988; Sithanandam et al., 1990). Dieser Signalweg reguliert die zelluläre Antwort auf Wachstumssignale. 2002 wurden Mutationen im *BRAF*-Gen für eine Vielzahl von Tumoren entdeckt, die zur erhöhten Kinaseaktivität führen (Peyssonnaud & Eychenne, 2001; Davies et al., 2002).

Badalin-Verly et al. konnten 2010 erstmalig eine Mutation des *BRAF*-Gens (V600E) bei 57 % der Langerhanszell-Histiozytosen feststellen. Diese Ergebnisse konnten durch weitere Arbeiten im Verlauf bestätigt werden (Berres et al., 2014; Brown et al., 2014; Nelson et al., 2015). Die Mutation führt durch den Austausch von Glutaminsäure gegen Valin an Position 600 zur Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweges (s. Abbildung 1). Es zeigten sich jedoch bis jetzt keine Zusammenhänge zwischen dem Mutationsstatus und der klinischen Ausprägung der LCH (Badalin-Verly et al., 2010; Minkov et al., 2016).

Unabhängig vom *BRAF*-Mutationsstatus der Läsion färbten sich in vorherigen Studien alle Langerhanszell-Histiozytosen in der Immunhistochemie mit den Antikörpern Phospho-MEK und Phospho-ERK positiv. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass allen Langerhanszell-Histiozytosen eine Überaktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweges zu Grunde liegt und bei *BRAF*-Wildtypen weitere unbekannte Mutationen innerhalb des Signalweges vorliegen (Badalin-Verly et al., 2010). Die Entdeckung der *BRAF*-Mutation klassifizierte die LCH erstmalig als neoplastische Erkrankung und war ein bahnbrechender Schritt für die Entstehungstheorie der Erkrankung (Minkov et al., 2016).

Mehrere Studien konnten eine Konkordanz von über 90 % zwischen der *BRAF*-Mutationsanalyse und der Expression von *BRAFV600E* in der Immunhistochemie nachweisen (Roden et al., 2014; Alayed et al., 2016), sodass wir in unseren Untersuchungen die Immunhistochemie als Surrogatmarker nutzten.

1.6.3 *MAP2K1*-Mutationen bei der Langerhanszell-Histiozytose

Weitere Untersuchungen des RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweges konnten Mutationen der *MAP2K1* nachweisen. Brown et al. fanden 2014 bei 50 % der BRAF-Wildtypen eine Mutation der *MAP2K1*, die wiederum eine Überaktivierung des MEK/ERK- Signalweges zur Folge hat. Während bei der Mutation von *BRAF* eine Substitution von Aminosäuren stattfindet, wurden bei der *MAP2K1*-Mutation hauptsächlich in-frame Deletionen im Exon 2 und 3 (v.a. E102_I103del) beschrieben. Aber auch vereinzelte Basensubstitutionen wurden von Brown et al. beobachtet (R47Q, R49C, A106T, C121S und G128V) (Brown et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde der *MAP2K1*-Mutationsstatus im Exon 2 und 3 mittels Sanger-Sequenzierung untersucht.

1.6.4 Die Anaplastische Lymphomkinase bei der Langerhanszell-Histiozytose

Bei der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK) handelt es sich um ein Protoonkogen, das auf dem Chromosom 2 kodiert ist. Ursprünglich wurde ALK als ein Teil des Fusionsgens NPM (Nucleophosmin)-ALK entdeckt. In den Untersuchungen von Morris et al. zeigte sich, dass das NPM-ALK Fusionsprotein als onkogene Tyrosinkinase für die Entstehung des Anaplastischen Lymphoms mitverantwortlich ist (Morris et al., 1994). Die Literatur zeigt, dass in den letzten Jahren weitere ALK-Translokationen mit verschiedenen Fusionspartnern (z. B. EML4, KIF5B) entdeckt wurden (Soda et al., 2007; Stoika et al., 2001). Die Fusion der Proteine hat zur Folge, dass es zur dauerhaften Kinaseaktivität und damit zu Stimulierung von Signalkaskaden kommt. 2016 konnten Diamond et al. mittels RNA-Sequenzierung in zwei Fällen die Fusion der ALK mit der N-terminalen Domäne von KIF5B bei Histiozytosen (Erdheim-Chester-Disease) mit *BRAF*-Wildtypen nachweisen. Dies führte dementsprechend zur Überexpression und dauerhaften Aktivierung der Anaplastischen Lymphomkinase, welche wiederum Bestandteil der MEK/ERK-Signalweges ist (Diamond et al., 2016). Bislang liegen jedoch noch keine Daten zu größeren Kollektiven mit ALK-Fusionsproteinen bei Langerhanszell-Histiozytosen vor. Ali et al. zeigten, dass eine Translokation beim Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom nicht nur mittels FISH detektiert werden kann, sondern auch mittels Immunhistochemie. Die aberrante Expression von ALK in der Immunhistochemie ist dabei die Folge einer Translokation im *ALK*-Gen (Ali et al., 2014). Dieses Ergebnis wurde dieser Arbeit zur Grundlage gemacht, um an kindlichen Langerhanszell-Histiozytosen den immunhistochemischen Antikörper ALK D5F3

als Surrogatmarker zu testen. Der monoklonale Kaninchenantikörper ALKD5F3 detektiert sowohl endogene ALK-Proteine als auch ALK-Fusionsproteine.

1.6.5 IL-17A bei der Langerhanszell-Histiozytose

Interleukin 17 ist ein für T-Helfer-Zellen spezifisches pro-inflammatorisches Zytokin, das erstmalig 1993 von Rouvier et al. als CTLA-8 beschrieben wurde (Rouvier et al., 1993). Die histologische Ähnlichkeit der LCH mit Granulomen, lässt IL-17A in der Pathogenese des inflammatorischen Begleitinfiltrates der LCH vermuten. Coury et al. fanden 2008 erstmalig erhöhte IL-17A Plasma-Titer bei Patienten mit aktiven Langerhanszell-Histiozytosen und konnten gleichzeitig die Synthese von IL-17A in den dendritischen Zellen nachweisen. Der entzündliche oder genetische Ursprung dieser Überexpression, konnte jedoch nicht geklärt werden (Coury et al., 2008). Später konnten Murakami et al. erstmalig ebenfalls eine IL-17A Expression in einem Teil von Langerhanszell Histiozytosen nachweisen und zeigten eine starke Expression in MS-LCH (Murakami et al, 2013). Weitere Studien konnten weder IL-17A mRNA noch IL-17A Protein in den Zellen der LCH nachweisen, sodass IL-17A eine noch unklare Rolle in der Pathogenese der LCH spielt (Allen et al., 2009; Peters et al., 2011).

In dieser Arbeit soll eine mögliche Überexpression von IL-17A, sowohl bei SS-LCH, als auch bei MS-LCH an einem großen pädiatrischem Patientenkollektiv mittels Immunhistochemie untersucht werden.

1.6.6 PD-L1 bei der Langerhanszell-Histiozytose

Der Programmed death-ligand 1 (PD-L1) wird physiologisch auf antigen-präsentierenden Zellen und vor allem auch auf histiozytären Makrophagen exprimiert (Keir et al., 2007). Physiologischerweise unterdrückt der Ligand im Zusammenspiel mit dem Rezeptor PD-1 (Programmed death receptor 1) die T-Zellaktivierung. Dieser Vorgang wird als Kontrollpunkt des Immunsystems verstanden, um körpereigene Zellen vor einer Immunantwort zu schützen. Bei einigen Neoplasien konnte eine Überexpression von PD-L1 beobachtet werden, wodurch die Immunantwort unterdrückt wird (Gravelle, et al., 2017; Keir et al., 2008; Pardoll P.M., 2012). Die Unterdrückung der PD-L1/PD-1-Interaktion mittels spezifischen Inhibitoren zeigte bereits vielversprechende Effekte in der Tumorthherapie. Die aktuelle Literatur zeigt jedoch bis dato vor allem Daten zur Therapie solider Tumoren (z. B. Melanom). Die wenigen Daten für hämatologische Tumore beziehen sich vor allem auf Hodgkin-Lymphome und zeigen ein gutes Ansprechen der Neoplasien (Gravelle et al., 2017). Gatalica et al. beschrieben erstmalig 2015

eine immunhistochemische Überexpression des Liganden bei systemischen Histiocyosen (Gatalica et al. 2015). Weitere Untersuchungen zeigten eine stärkere Expression von PD-L1 bei Patienten mit *BRAF*- Mutationen (Zeng et al., 2016). Der Einsatz von PD-1- bzw. PD-L1 stellt also auch bei der Langerhanszell-Histiozytose ein potentielles Therapietarget dar.

In dieser Arbeit soll eine mögliche Überexpression von PD-L1, sowohl bei SS-LCH, als auch bei MS-LCH an einem großen Patientenkollektiv mittels Immunhistochemie untersucht werden.

1.6.7 SH-PTP1 bei Langerhanszell-Histiozytose

SH-PTP1 gehört zu den Tyrosin-Protein-Phosphatasen, die auch als PTP-1C bekannt sind. Die Tyrosin-Protein-Phosphatasen regulieren über die Dephosphorylierung von Proteinen die Genexpression und haben so u.a. Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Migration (Lu et al., 2009). Sie gelten als ein wichtiger Regulator der Dendritischen Zellen (DZ) und der T-Zell induzierten Immunantwort (Ramachandran et al., 2011). Sowohl die Überexpression als auch die verminderte Expression von SH-PTP-1 wurde in verschiedenen Tumorarten beobachtet (Mok et al., 1995; Zhang et al., 2000; Oka et al., 2001; Julien et al., 2011). Murakami et al. konnten 2011 eine immunhistochemische Überexpression von SH-PTP-1 bei Langerhanszell-Histiocyosen feststellen. Dabei wurde eine signifikant größere Expression bei den multisystemischen LCH beobachtet (Murakami et al., 2011).

In dieser Arbeit soll eine mögliche Überexpression von SH-PTP1 sowohl bei SS-LCH, als auch bei MS-LCH an einem großen Patientenkollektiv mittels Immunhistochemie untersucht werden.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde ein großes pädiatrisches Patientenkollektiv von Langerhanszell-Histiocyosen unter Berücksichtigung der klinischen Präsentation untersucht. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie ist das immunhistochemische Expressionsprofil der Langerhanszell-Histiocyotose für die untersuchten Antikörper IL17-R, PD-L1, ALKD3F5 und SH-PTP1, und finden sich Korrelationen mit der klinischen Präsentation der Erkrankung?
2. Wie häufig lassen sich *BRAF*- bzw. *MAP2K1*-Mutationen in dem hier vorliegenden rein pädiatrischem Kollektiv nachweisen? Lassen sich die Literaturdaten zu *BRAF*- und *MAP2K1*-Mutationen bei Langerhanszell-Histiocyosen an einem größeren Kollektiv

kindlicher LCH bestätigen? Zeigen sich Unterschiede in der Rate der *BRAF*- bzw. *MAP2K1*-Mutationen bezüglich der lokalisierten versus systemischen LCH?

2 Untersuchungsgut und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Im Rahmen dieser Studie wurden 184 Langerhanszell-Histiozytosen des Kindesalters (aus dem Archiv des Kindertumorregisters der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) untersucht. Bei dem Material handelt es sich um formalinfixierte und in Paraffin gebettetes Tumormaterial aus den Jahren 2000 bis 2012. Im Rahmen der Diagnostik lagen bei Einsendung für 37 Patienten aus der Korrespondenz klinische Informationen vor. Die vorliegende Information bezieht sich lediglich auf die Ausdehnung der Langerhanszell-Histiozytose als monosystemische oder multisystemische Erkrankung. Es liegen keine weiteren Informationen über die Verläufe der Erkrankungen vor. Die Gewebeparbeitung erfolgte anonymisiert. Alle Arbeitsschritte dieser Arbeit wurden in den Laboren des Instituts für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

2.1.1 Histopathologisches Review

Zunächst wurden alle (n=184) Hämatoxylin-Eosin(HE)-Einzelschnitte der in Frage kommenden Langerhanszell-Histiozytosen unter dem Mikroskop hinsichtlich der Tumormasse beurteilt. Diese Schnitte wurden bereits im Rahmen der Diagnostik angefertigt. Bei vorhandener Langerhanszell-Histiozytose wurde von dem entsprechenden Fall eine Langerinfärbung angefertigt, um die Histiozytose zu verifizieren. In 39/184 Fällen konnten keine Langerhanszellen gefunden werden, weswegen sie aus den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Anhand der Langerinschnitte wurde die Tumormasse quantifiziert und die entsprechenden Areale mit einem großen Anteil von Langerhanszellen auf dem Paraffinblock markiert. Aus dem Bereich dieser Markierungen wurden dann jeweils zwei Stenzen für die Tissue Microarrays entnommen. Die mikroskopische Beurteilung der Färbungen und Einteilungen erfolgte stets durch zwei Personen.

2.2 Anfertigen von Tissue Microarrays

Bei einem Tissue Microarray (TMA) handelt es sich um Gewebezyylinder (Durchmesser 0,6mm) aus ausgewähltem Material, die in einen gemeinsamen Paraffinblock gebettet werden, um daraus Paraffinschnitte anzufertigen. Diese Technik ermöglicht es viele kleine Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger gleichzeitig zu färben und nebeneinander zu beurteilen. Insgesamt wurden aus den 184 untersuchten Fällen pro Fall jeweils zwei Stanzen aus repräsentativen tumorhaltigen Arealen entnommen. Damit wurde eine Anzahl von 368 Stanzen auf acht TMA-Blöcken erreicht.

2.2.1 Schnittanfertigung der TMA

Von den Tissue Microarrays wurden am Rotationsmikrotom (Leica, RM 2245) Schnitte von 2-3 µm Dicke hergestellt und auf LEICA Bond TM Plus Slides Objektträger aufgezogen.

2.3 Immunhistochemische Färbungen

Die Tissue Microarrays wurden immunhistochemisch mithilfe von verschiedenen Antikörpern untersucht. Dabei nutzt man das Prinzip der Färbung von bestimmten Strukturen der Zellen mithilfe von an Antikörpern gekoppelten Farbstoffen. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper ist in Tabelle 5 dargestellt.

Marker	Verdünnung	Spezies	Klon	Material	Puffer-Lösung	Quelle
Langerin	1:100	Maus	12D6 monoklonal	FFPE	pH8	Leica, Wetzlar, DE
BRAF V600E	1:25	Maus	VE1 monoklonal	FFPE	pH6	Spring Bioscience, Pleasanton, CA, US
ALK D5F3	1:200 mit DAB Verstärkung	Kaninchen	D5F3 monoklonal	FFPE	pH8	Cell Signaling, Danvers, MA, US
IL-17A	1:200	Kaninchen	EPR1544(2) 1 polyklonal	FFPE	pH8	LifeSpan Bioscience, Seattle, WA, US
SH-PTP1	1: 1500	Kaninchen	C19 polyklonal	FFPE	pH6	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, US
PD-L1 (R+D)	1:50	Maus	130021 monoklonal	FFPE	pH6	R&D Systems, Minneapolis, MN, US
PD-L1 (CS)	1:50	Kaninchen	E1L3N monoklonal	FFPE	pH6	Cell Signaling, Danvers, MA, US

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Antikörper.

2.3.1 Gewebepreparierung

Durch die Formalinfixierung kann es im fixierten Gewebe zur Maskierung der Antigene kommen. Durch die Vernetzung der Epitope werden sie in ihrer Struktur verändert und nicht erkannt. Deshalb ist eine Hitzebehandlung des Gewebes notwendig. Für die Vorbehandlung werden die Präparate zunächst für ca. 40 Minuten in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe bis zum Aqua dest. dehydriert (100 % dreimal, 96 % zweimal, 70 % einmal). Um die endogene Peroxidase zu blockieren, die zu falsch positiven Färbungen führen kann, werden die Objektträger in einem Methanolbad mit 4 %-tigem H₂O₂-Anteil (6-8ml Wasserstoffperoxid (30 %) in 200ml Methanol) für 10 Minuten inkubiert. Danach werden die Schnitte mit Aqua dest. und PBS-Waschpuffer gewaschen.

Für die Hitzebehandlung (engl. „heat induced epitope retrieval“ (HIER)) gilt prinzipiell, dass die Präparate zur Demaskierung der Antigene in einer Pufferlösung (Citratpuffer pH6 oder pH8) bei entsprechendem pH-Wert drei Minuten im Dampfkochtopf gekocht werden. Anschließend werden die Schnitte wieder mit Aqua dest. und PBS-Waschpuffer gewaschen.

2.3.2 Immunohistochemische Färbung nach Histofine®

Das Prinzip dieser immunohistochemischen Färbung basiert auf der Reaktion eines Antikörpers, der an ein Antigen auf dem Paraffinpräparat gebunden ist, mit dem Histofine® Immun-Peroxidase Polymerkomplex (s. Abbildung 3). Diese Reaktion resultiert in einer farbigen Markierung im Bereich des nachzuweisenden Antigens. Zunächst wird der primäre Antikörper (Verdünnung mit HAMA-ELISA, medac) auf das Präparat gegeben. Dadurch kommt es zur Antigen-Antikörperbindung. Nach 60-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur in der feuchten Kammer wird das Präparat erneut gewaschen und mit 2-4 Tropfen des Immunoperoxidase Polymers (sekundärer Antikörper) bedeckt. Nach 30 Minuten wird der Objektträger erneut gewaschen und mit dem Chromogen-/Substrat-Reagenz (auf 1000µl Substrat-Puffer kommen 20 µl DAB-Chromogen) komplett bedeckt. Nach ca. fünf minütiger Inkubation wird das Präparat mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgt mit Hämalaun (1:4) und das Waschen mit warmen Leitungswasser. Eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol dient der Dehydrierung, um den Objektträger dann mit Pertex einzudecken.

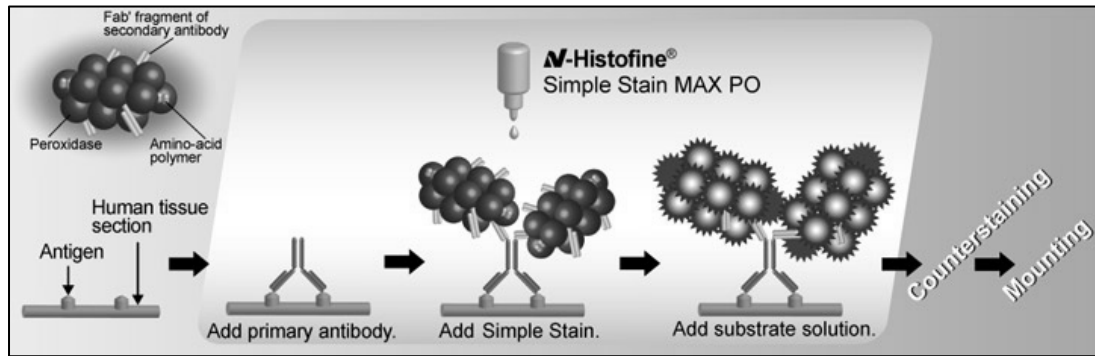


Abbildung 3. Prinzip der immunhistochemischen Färbung nach Histiofine®.

Mit freundlicher Genehmigung der Firma Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan.

2.3.3 Materialienliste für die Arbeitsschritte in Kapitel 2.3

Arbeitsgeräte:

- TMA-Gerät: Manual Tissue Arrayer, Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA
- Rotationsmikrotom: Leica RM 2245, Leica, Wetzlar, Deutschland
- Dampfkochtopf: Silit Sicomatic® Econrol, WMF Group GmbH, Geislingen/Steige, Deutschland
- Pipettenspitzen: Biosphere® Filter Tips, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 - 1250 µl extra long
 - 2-100 µl Ref. 70.760.212
- Pipetten: Biozym Presicion® 100-1000 µl, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Pipetten: BIOHIT Proline 5-50 µl, Ellesmere Port, England
- Feuchte Kammer, Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland
- Objektträger Glasküvette, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Materialien:

- Objektträger: LEICA BOND TM Plus Slide, Leica, Wetzlar, Deutschland
- Xylene, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- EMPLURA® Ethanol absolute, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methanol, AN:8045, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Wasserstoffperoxid 30 %: Perhydrol, AN: 1.07210.0250, Merck, Darmstadt, Deutschland
- BOND Polymer Refine Detection, Leica, Wetzlar, Deutschland

- Waschpuffer: PBS (Phosphate Buffered Saline), Thermo Scientific, Wilmington, USA
- Citronensäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Antikörperverdünungspuffer für die Immunhistochemie, REF B1-31C, medac diagnostika, Wedel, Deutschland
- Histofine: Simple Stain MAX PO (Multi), Sekundärantikörper, Universal Immuno-Peroxidase Polymer, anti-mouse and-rabbit, REF 414152F, Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japan
- DAB: Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, REF K3467, Dako, Glostrup, Dänemark
- Hämalun nach Mayer: AN: 1.09249.0500, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Pertex: AN: PER 40000, Medite, Burgdorf, Deutschland
- Dako Peroxidase Blocking: AN: S2001, Dako, Glostrup, Dänemark
- Deckgläschen, Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland

2.4 Molekulare Analyse zum *MAP2K1*-Mutationsstatus

Die Mutationsdiagnostik des *MAP2K1*-Gen erfolgte am formalinfixierten Paraffinmaterial von 47 *BRAF*-Wildtypen mittels Sangersequenzierung der Exons 2 und 3 in folgenden Arbeitsschritten. Alle Arbeitsschritte bis zur Auswertung am AbiPrism (s. Kapitel 2.4.9) wurden selbstständig von der Autorin durchgeführt.

2.4.1 DNA-Isolierung

Um die DNA aus dem Paraffinmaterial zu extrahieren, müssen von jedem Gewebeblock zunächst 10 5 µm-Paraffinschnitte am Rotationsmikrotom angefertigt werden. Um ausschließlich Tumor-DNA zu erhalten, erfolgt die Makrodissektion. Hierfür werden die Gebiete mit einer hohen Langerhanszell-Histiozytosedichte von den Objektträgern mit einem sterilen Skalpell abgekratzt und in einem Eppendorf- Mikroreaktionsgefäß gesammelt. Um das überschüssige Paraffin zu lösen, werden in jedes Zentrifugenröhrchen 1 ml Xylol dazugegeben. Die Ansätze werden dann jeweils 30 Sekunden gevortext und 10 Minuten inkubiert bevor sie bei 13.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen. Nach der Wiederholung dieser Schritte folgt die 10-minütige Inkubation mit 1ml 100 %tigem Ethanol und die 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Auch hier wird der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Gewebe muss anschließend bei 37 °C für ca. 2 Stunden stehen damit der Alkohol sich verflüchtigen kann. Um nun die Nukleinsäuren aus den Gewebepallets freizusetzen, werden zu den Proben 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K

gegeben und bei 56 °C und 850 bpm über Nacht (16-20 Stunden) im Thermomixer geschüttelt. Danach folgt die Erhitzung für eine Stunde auf 90 °C. Es werden 200 µl AL-Puffer dazugegeben und sofort gevortext. Das Eppendorfgefäß wird für 10 Minuten bei 70 °C auf den Thermomixer geben. Anschließend werden noch 200 µl 100 %-tiges Ethanol hinzugefügt. Das Ganze dann kurz vortexen und fünf Minuten inkubieren. Dieses Lysat wird auf einen QIAmp-Filter gegeben und zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Collection-Tube mit dem Durchfluss verwerfen und die Säule auf ein neues Collection-Tube setzen. Sollte noch Flüssigkeit auf dem Filter sein, nochmals zwei Minuten bei max. 13.000 rpm zentrifugieren. Danach werden 500 µl AW1-Puffer und 500 µl AW2-Puffer dazugegeben; jeder Puffer muss jeweils zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert werden. Der Durchfluss wird verworfen. Bevor die DNA-Konzentration gemessen werden kann, muss der Filter in ein Eppendorfgefäß gesetzt werden und ca. 20 µl AE-Puffer auf den Filter geben werden. Mindestens zwei Minuten inkubieren, damit sich die DNA lösen kann. Nochmals bei 10.000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert werden und den Filter danach verwerfen. In dem Eppendorfhütchen befindet sich nun die heraus gelöste DNA.

2.4.2 DNA-Messung am Nanodrop

Die Nukleinsäurekonzentration der isolierten DNA wird mithilfe des Spektrometers Nanodrop 2000c bestimmt. Dafür müssen zunächst die obere und untere optische Oberfläche mit 1 µl Wasser gereinigt werden. Nach dem Schließen des Hebelarmes sollte die Oberfläche mit einem fusselfreien Labortuch abgewischt werden. Dann kann 1 µl der entsprechenden Probe auf das Gerät gegeben werden und der Hebel geschlossen werden. Es wird die Absorption der Lösung bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Die Software berechnet automatisch die Nukleinsäure-Konzentration und Reinheit der Probe. Ein Vorteil dieses Gerätes gegenüber herkömmlichen Photometern ist die geringe Menge der einzusetzenden Probenflüssigkeit.

2.4.3 *MAP2K1*-PCR

Um die Exons 2 und 3 zu sequenzieren, muss zunächst die gewonnene DNA mithilfe der Polymerasekettenreaktion vervielfältigt werden. Der PCR-Reaktionsansatz besteht aus 20 µl MasterMix (vorgefertigter Prämix) und 5 µl DNA (entspricht 50 ng DNA) (s. Tabelle 6).

Reagenzien	Menge in μl
H ₂ O	12,5
10x True Start Taq Buffer	2,5
2mM dNTPs	1,25
10 pmol/ μl MAP2K1for1	1,0
10 pmol/ μl MAP2K1rev1	1,0
MgCl ₂ (2,5mM)	1,5
True Start hot Start Taq DNA Polymerase	0,25

Tabelle 6: MasterMIX für die PCR mit einem 5 μl DNA-Ansatz

In einigen Fällen war die Polymerasekettenreaktion mit dem MasterMix nicht möglich. Die DNA wurde dann mittels dem PyroMark PCR Kit von Qiagen (s. Tabelle 7) wiederholt.

Reagenzien	Menge in μl
H ₂ O	3,0
PyroMark PCR Master Mix	12,5
Coral Load	2,5
10 pmol/ μl MAP2K1for1	1,0
10 pmol/ μl MAP2K1rev1	1,0

Tabelle 7: PyroMark PCR Kit von Qiagen für die PCR mit 5 μl DNA-Ansatz

Die Polymerasekettenreaktion erfolgt im PTC-200 Thermal Cycler® nach dem in Tabelle 8 dargestellten Protokoll.

Arbeitsschritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1	95	15:00
2	95	0:30
3	54	0:30
4	72	0:30
5	Arbeitsschritte 2-4 insgesamt 40x wiederholen	
6	72	10:00
7	10	oo

Tabelle 8: PCR-Protokoll für die MAP2K1-PCR

2.4.4 Agarose- Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden die Nukleinsäuren der zuvor gewonnenen DNA nach ihrer Größe mithilfe eines elektrischen Feldes getrennt. Dafür wird ein Agarosegel benötigt, das zunächst angesetzt werden muss. In diesem Fall wurde TAE-Puffer (TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer) benutzt. Dieser wird aus 40 ml 50x TAE Puffer auf 2 l Aqua dest. hergestellt. Dann werden 6 g Agarose mit 300 ml TAE-Puffer zusammenpipettiert und in der Mikrowelle auf höchster Stufe bei offenem Deckel für 3 Minuten erhitzt. Zwischendurch muss die Lösung herausgenommen und geschwenkt werden. Anfangs ist sie trübe, wird dann aber klar. Es folgt die Abkühlung des fertigen Agarosegels für 15 Minuten im Trockenschrank (55 °C). Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen, werden 3 µl Fluoreszenzfarbstoff GelRed auf eine Plastikplatte gegeben und 25 ml Agarosegel mit dem Kamm darauf verteilt. Für alle Fälle, in denen kein PyroMark PCR Kit verwendet wurde, muss die DNA mit DNA-Auftragspuffer vorbereitet werden. Dafür werden 5 µl PCR Produkt (bzw. am Anfang und am Ende DNA-Ladder) mit 1 µl DNA Auftragspuffer in 0,5 ml Tubes vorgelegt. Danach wird die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer aufgefüllt, die Keile und der Kamm entfernt und 5 µl der Probe dazugegeben. Es werden 100 V für 25 Minuten angelegt. Die entstandenen Banden werden im Gel-Doc fotografiert und ausgewertet.

2.4.5 PCR-Produkt-Aufreinigung

Um mögliche Störgrößen durch Verunreinigungen, wie z. B. Salze zu minimieren, ist die Aufreinigung des PCR-Produktes notwendig. Dafür werden 20 µl PCR-Produkt mit 280 µl NTI-Puffer zusammenpipettiert und gevortext. Das Lysat wird in eine Säule pipettiert, die auf einer Collection-Tube steht und muss für 30 sec bei 11.000 rpm zentrifugiert werden. Der Durchfluss wird verworfen. Es werden 700 µl NT3 Puffer hinzugegeben und bei 11.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Den Durchfluss wieder verworfen. Die letzten beiden Schritte müssen wiederholt werden. Die, im Collection-Tube enthaltene, Silizium Membran wird getrocknet, indem sie nochmals bei 11.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert wird. Danach wird die DNA mit einem Elutionspuffer (NE-Puffer) für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und bei 11.000 rpm für eine Minute zentrifugiert.

2.4.6 Erneute DNA-Messung am Nanodrop

s. Kapitel 2.4.2.

2.4.7 DNA-Sequenzierung

In dieser Arbeit wurde die DNA-Sequenzierung nach Sanger angewandt (Sanger et al., 1977). Die Sanger-Sequenzierung ermöglicht die Bestimmung einer Basenabfolge innerhalb eines bekannten DNA-Moleküls. Die Reaktion besteht zusammengefasst aus drei wesentlichen Schritten, die einen Zyklus bilden: der Denaturierung, dem Annealing und der Polymerisierung. Zunächst werden die Wasserstoffbrückenverbindungen der DNA durch Erhitzen getrennt und die DNA somit in ihre Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Es folgt die Anlagerung der Primer an die komplementäre Zielsequenz der DNA (Annealing). Bei der Polymerisierung erfolgt durch Zugabe von Desoxynukleotiden, DNA-Polymerase und Didesoxynukleotiden (Kettenabbruch-Nukleotide) die Synthese des komplementären DNA-Stranges. Durch den Einbau der Didesoxynukleotide kommt es zum Kettenabbruch. Eine weitere Verlängerung der DNA-Matrix ist aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am C3-Atom der Didesoxynukleotide nicht möglich. Es entstehen letztendlich unterschiedlich große DNA-Fragmente, die sich im Folgenden ihrer Größe nach auftrennen lassen.

Für die Sequenzierung der *MAP2K1*-DNA werden ca. 15 ng aufgereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Davon werden 1 µl PCR-Produkt mit 19 µl MasterMIX (s. Tabelle 9) gemischt. Die Sequenzierung erfolgt am 3500 Genetic Analyzer® (Hitachi) nach dem in Tabelle 10 angegebenen Protokoll.

Reagenzien	Menge in µl
H ₂ O	14,5
5x Puffer	2,0
BigDye	2,0
10 pmol/µl MAP2K1for1 bzw. 10 pmol/µl MAP2K1rev1	0,5

Tabelle 9: Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion (MasterMIX)

Arbeitsschritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1	96	00:20
2	53	0:15
3	60	4:00
4	Arbeitsschritte 1-3 insgesamt 27x wiederholen	
6	10	oo

Tabelle 10: Sequenzierungs-Protokoll

2.4.8 Aufreinigung der Sequenzierung

Um die Analyse der Sequenzierungsergebnisse zu verbessern, werden die Proben mithilfe des NucleoSEQ-Kit (Macherey&Nagel) aufgereinigt. Dazu muss das bereits in den vorgefertigten Säulen enthaltende Trockengel vor Gebrauch eine Minute bei 3.500 rpm zentrifugiert werden und 30 Minuten vor Gebrauch mit 600 µl Wasser angesetzt werden. Direkt vor der Aufreinigung muss die untere Kappe der Säule entfernt werden und bei 3.500 rpm für 2 Minuten zentrifugiert werden. Die Säule wird dann auf ein 1,5 ml Eppendorfer-Gefäß gesetzt und die Sequenzierprobe in die Mitte des Säulenmaterials pipettiert und 5 Minuten bei 3.500 rpm zentrifugiert. Das Gel in den Säulen hält dabei Verunreinigungen zurück und der Durchfluss kann als aufgereinigte Sequenzierreaktion auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen werden. Da die Auswertung immer als komplette Reihe erfolgt, muss bei ungenügendem Probenmaterial die weiteren Vertiefungen mit Wasser aufgefüllt werden.

<i>MAP2K1</i> Exon 2 PCR Forward	5'-TGACTTGTGCTCCCCACTTT-3'
<i>MAP2K1</i> Exon 2 PCR Reverse	5'-GTCCCCAGGCTTCTAAGTACC-3'
<i>MAP2K1</i> Exon 3 PCR Forward	5'-TCATCCCTTCCTCCCTCTTT-3'
<i>MAP2K1</i> Exon 3 PCR Reverse	5'-CTCTTAAGGCCATTGCTCCA-3'

Tabelle 11: Verwendete Primer-Sequenzen

2.4.9 Auswertung am AbiPrism3500

Das gewonnene und aufgereinigte Sequenzierungsprodukt wird mittels einer Kapillarelektrophorese in seine Fragmente aufgetrennt. Diese Elektrophorese ermöglicht die Auftrennung von fluoreszenzmarkierten DNA-Molekülen mit einem Unterschied von einem Nukleotid. Die 3500 Data Collection Software des AbiPrism3500 konvertiert und visualisiert die Fluoreszenzsignale in digitale Dateien. Dabei entsprechen die vier Farben der Signale der vier Basen der DNA. Es folgt die manuelle Auswertung des DNA-Chromatogramms.

2.4.10 Materialienliste für die Arbeitsschritte in Kapitel 2.4

Arbeitsgeräte:

- Mikrotom, Microm HM 355S, Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA
- Zentrifuge: Biofuge 13, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Skalpell: Feather Disposable Scalpel No. 22, CellPath, Newtown, UK
- Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, Wilmington, USA
- Rotophorese Kammer PROclamp MAXI, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Spannungsgerät: Roth Power Supply BLOT, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- UVP GelStudio PLUS, analytik Jena, Jena, Deutschland
- Abi Prism 3500, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
- Thermomix: Tmix , analytik jena, Jena, Deutschland
- Brutschrank: Universal Oven U, Memmert, Schwabach, Deutschland
- Vortex-Schüttler: VV3, VWR, Dublin, Irland
- MJ Research PTC-200 Thermal Cycler, Marshall Scientific, Hampton, USA
- 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA

Materialien:

Allgemein:

- Pipettenspitzen: Biosphere® Filter Tips, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 - 1.250 µl extra long
 - 2- 100 µl Ref. 70.760.212
- Pipetten: Biozym Precision ® 100-1.000 µl; BIOHIT Proline 5 -50 µl, Biozym Biotech, Wien, Österreich

DNA-Isolation:

- Eppendorf Tubes 1,5 ml mit Deckel, neutral, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
- Objektträger: LEICA BOND TM Plus Slide, Leica, Wetzlar, Deutschland
- DNA-Isolierungs-Kit: DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Cat. No. 69504, Quiagen, Hilden, Deutschland
- EMPLURA® Ethanol absolute, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Xylene, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- DNA-Konzentration am Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA

PCR:

- dNTP-Mix (10 mM each), Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
- MAP2K1-Primer, Biomers, Ulm, Deutschland

- PCR: True Start, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
- PyroMark PCR Kit Qiagen, Quiagen, Hilden, Deutschland

Agarosegel:

- Elektrophorese: Rotiphorese 50X TAE Puffer, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- GelRed Nucleic Acid Stain, BIOTREND Chemikalien, Köln, Deutschland
- O'Range Ruler 50 bp DNA-Ladder, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
- Universal Agarose, Bio&SELL, Feucht bei Nürnberg, Deutschland

Aufreinigung des PCR-Produktes:

- PCR-Aufreinigung: NucleoSpin Gel and PCR CleanUp, DNA, RNA and Protein purification, Macherey&Nagel, Düren, Deutschland

Sequenzierreaktion:

- Sequenzierung: BigDyeTerminator V1.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
- MAP2K1-Primer

Aufreinigung der Sequenzierreaktion:

- Sequenzier-Aufreinigung: NucleoSEQ Columns, DNA, RNA and Protein purification, Macherey&Nagel, Düren, Deutschland

ABI-Prism:

- AbiPrism3500: Septa 96-well 3500 series, 20 Stück, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA

2.5 Auswertung

2.5.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen der Tissue Microarrays wurden unter dem Mikroskop (ZEISS, Axioskop 40) in 10- und 20-facher Vergrößerung betrachtet. Zunächst wurde mithilfe der Langerin-Färbung die Quantität der angefärbten Tumormasse in Prozent angegeben. Dies diente der Verifizierung, ob genügend LCH-Material auf den entnommenen Stanzen vorhanden war. In einigen Fällen konnte keine Tumormasse in der Stanze nachgewiesen werden. Die betroffenen Fallnummern wurden bei den weiteren Färbungen nicht berücksichtigt. Für jeden Antikörper wurde eine On-Slide Positivkontrolle verwendet, um die Qualität der Färbung zu überprüfen. Das jeweilige Material für die Kontrollen variierte je nach Marker.

Langerin: Als Positivkontrolle für die Langerinfärbung wurde menschliche Tonsille verwendet. Der verwendete Antikörper führte sowohl zur zytoplasmatischen als auch zur membranösen Färbung, sodass alle Langerhanszellen mit einer membranösen und/oder zytoplasmatischen Färbung als positiv gewertet wurden. Bei einer spezifischen Reaktion in >10 % der Langerhanszellen wurde der jeweilige Fall als positiv gewertet.

IL-17A: Als Positivkontrolle der IL-17A Färbung diente das Material einer menschlichen Tonsille. Die Auswertung der IL17A- Färbung erfolgte semi-quantitativ (0 = negativ, 1 = positiv gefärbtes Begleitinfiltrat, 2 = positiv gefärbte Langerhanszellen) Eine spezifische Reaktion in >30 % der Zellen wurde als positiv gewertet.

SH-PTP1: Als Positivkontrolle für die SH-PTP1 Färbung diente die menschliche Tonsille. Die Immunhistochemie erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper, der typischerweise zur zytoplasmatischen Zellmembrananfärbung führt. Eine spezifische Reaktion in >30 % der Tumorzellen wurde als positiv gewertet.

ALKD5F3: Als Positivkontrolle für die ALKD5F3-Färbung diente die menschliche Tonsille. Der monoklonale Kaninchenantikörper ALK D5F3 detektiert sowohl endogene ALK-Proteine als auch ALK-Fusionsproteine. Jegliche spezifische Reaktion ab 1 % gefärbter Tumorzellen wurde als positiv gewertet.

PD-L1: Die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper PD-L1 erfolgte mit dem Antikörper von zwei verschiedenen Herstellern. Da aus der Literatur bereits große Unterschiede in der Sensitivität der Antikörper bekannt sind, wurden hier zwei verschiedene Klone untersucht, um ihren diagnostischen Nutzen zu bestimmen (Smith et al., 2016). Für beide Antikörper wurde menschliche Plazenta als Positivkontrolle verwendet. Es folgte die

qualitative Bewertung der Stenzen nach ihrer membranösen Färbequalität. Eine spezifische Reaktion in > 30 % der Tumorzellen wurde als positiv gewertet. Das zytoplasmatische Färbemuster und die Färbeintensivität wurden nicht beachtet, da dies bisher in Studien keinen prädiktiven Wert zeigte (Garon et. al., 2015).

BRAFV600E: Als Positivkontrolle für die BRAF-Färbung diente menschliche Tonsille. Es wurde die zytoplasmatische Färbung der Langerhanszellen mit dem Antikörper BRAFV600E beurteilt. Eine spezifische Reaktion in >30 % der Tumorzellen wurde als positiv gewertet.

2.5.2 Auswertung der molekularen *MAP2K1*-Mutationsdiagnostik

Die Mutationsanalyse des *MAP2K1*-Gen erfolgte bei allen Tumoren mit einem negativen Nachweis von BRAFV600E in der Immunhistochemie. Die Analyse erfolgte außerdem nur sofern noch genügend paraffingebettetes Tumormaterial für die DNA-Isolation zur Verfügung stand. Insgesamt wurden 59 Fälle auf eine Mutation im Exon zwei und drei der *MAP2K1* untersucht. In 12 Fällen war die isolierte DNA nicht ausreichend oder das PCR-Produkt verunreinigt, sodass eine auswertbare Gesamtanzahl von 47 Fällen übrig blieb. Die Sequenzen der Proben werden mit der Sequenz eines *MAP2K1*-Wildtypes verglichen. Dazu werden die Chromatogramme der Sequenzierungen analysiert.

2.5.3 Statistik

Die Auswertung der immunhistochemischen Expressionsprofile erfolgte rein deskriptiv mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA). Die Auswertung der einzelnen immunhistochemischen Marker hinsichtlich ihrer Korrelation mit der klinischen Ausprägung (SS/MS-LCH) erfolgte mithilfe des zweiseitigen Exakten Tests nach Fisher. Für die Expression des Antikörpers IL-17A war die Erweiterung des Exakten Tests nach Fisher um den Freeman-Halton Test notwendig. Diese statistische Auswertung wurde ebenfalls mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel durchgeführt und später mit dem Statistikprogramm JASP (JASP 0.8.4, Amsterdam, Niederlande) überprüft.

Zur Auswertung der Altersverteilung, in der Kohorte mit und ohne *BRAF*- bzw. *MAP2K1*-Mutation, wurde der Mann-Whitney-U Test im Statistikprogramm SPSS (SPSS, IBM, Armonk, NY, USA) angewandt. Die Konkordanz der beiden verschiedenen Klone des Markers PD-L1 wurde mittels des Cohens Kappa ebenfalls im SPSS berechnet. Das Signifikanzniveau der p-Werte beträgt für alle angewandten Tests $p \leq 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenalter, Geschlechterverteilung und Ausprägung der LCH

Insgesamt wurden von 184 Fällen kindlicher Langerhanszell-Histiozytosen aus dem Archiv des Kindertumorregisters der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) TMA-Stanzen angefertigt. In 33 Fällen lösten sich die Stanzen aus dem Paraffinblock, sodass keine Färbung beurteilt werden konnte. Bei den verbleibenden 151 Fällen konnten auf den TMAs in sechs Fällen keine Langerin positiven Langerhanszell-Histiozytosen nachgewiesen werden. Diese sechs Fälle werden für die weitere Auswertung herausgenommen. In 14 weiteren Fällen haben sich die Tumorstanzen für die Langerinfärbung aus dem Paraffinblock herausgelöst und können nicht sicher als Langerhanszell-Histiozytose beurteilt werden. Für sie wird angenommen, dass Tumormaterial vorhanden ist.

Es bleibt ein auszuwertendes Gesamtkollektiv (n=145) von 95/145(68,5 %) männlichen Patienten, 47/145 weiblichen (31,5 %) Patientinnen und drei Fällen (2 %) mit unbekanntem Geschlecht. Das Durchschnittsalter bei Ersterkrankung aller Patienten lag bei 8,8 Jahren mit einem Median von 6,2 Jahren. Prinzipiell handelt es sich in dieser Arbeit um ein pädiatrisches Kollektiv. In dem Kollektiv befinden sich jedoch zwei Patienten/innen mit einem Alter >18 Jahren. Sie wurden in der weiteren Auswertung nicht herausgenommen.

Klinische Daten waren lediglich für 37 Fälle vorhanden. Unter den Erkrankten befanden sich 25/37 bekannte Fälle mit einem monosystemischen Befall und 12/37 Fälle mit einem multisystemischen Befall. Die Geschlechterverteilung unter den 37 Fällen mit bekannter Krankheitsausprägung ist in der Tabelle 12 dargestellt. Der Altersmedian aller Fälle mit bekannten klinischen Daten liegt bei 4,5 Jahren (Mittelwert: 6,0 Jahre). Das mediane Alter in der Gruppe der SS-LCH liegt bei 5,5 Jahren (Mittelwert: 6,7 Jahre). Das mediane Alter unter den multisystemischen LCH liegt bei 2,5 Jahren (Mittelwert: 4,6 Jahre). Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test lässt sich feststellen, dass diese Altersverteilung zufällig auftritt und keine Zusammenhänge aufweist (p= 0,117). Die beiden Fälle mit einem Erkrankungsalter >18 Jahren wurde in dieser Gruppe mit klinischen Daten nicht beachtet.

	Krankheitsausprägung		
Geschlecht	SS-LCH	MS-LCH	Total
männlich	17	6	23
weiblich	8	6	14
Total	25	12	37

Tabelle 12: Übersicht der Geschlechterverteilung im Bezug zur klinischen Präsentation

3.2 Immunhistochemische Auswertung

Die Anzahl der immunhistochemisch auszuwertenden Tumoren variiert je nach Färbung, da sich in einigen Fällen einzelne Stenzen aus dem Paraffinblock herausgelöst haben. Die Auswertung der einzelnen Färbungen erfolgte nach dem in Kapitel 2.5.1. angegebenen Prinzip.

3.2.1 Immunhistochemischer Langerin-Nachweis

Die Langerinfärbung diente vor allem der Bestätigung der Diagnose der Langerhanszell-Histiozytose in den Gewebestanden. Es erfolgte die Auswertung entsprechend der in Kapitel 2.5.1 genannten Kriterien. Insgesamt stand ein Kollektiv von 151 Fällen als TMA zur Verfügung.

In 6/151 Fällen waren keine Langerin positiven Zellen im Material nachzuweisen. Es war davon auszugehen, dass kein Tumormaterial in den Stenzen vorhanden ist. Die weiteren immunhistochemischen Färbungen lassen sich für die Fälle mit negativer Langerinfärbung nicht beurteilen und werden bei der weiteren Auswertung nicht beachtet. In 14/151 Fällen sind die Langerinstanzen nicht auf dem Objektträger vorhanden. Bei den Fällen mit herausgelöster Stanze wird angenommen, dass Langerhanszell-Histiozytosematerial vorhanden ist. Diese Fälle werden wie Langerin positive Fälle in den weiteren immunhistochemischen Färbungen ausgewertet. Insgesamt können somit im Folgenden 145 Fälle mit einer Langerhanszell-Histiozytose immunhistochemisch untersucht werden.

3.2.2 Immunhistochemischer IL-17A-Nachweis

Für diese Färbung konnten insgesamt 135 Fälle beurteilt werden. Die Beurteilung der Färbung wird anhand der im Kapitel 2.5.1 aufgeführten Kriterien durchgeführt. Mit 100/135 Fällen (74 %) zeigte der überwiegende Anteil der Tumoren sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Patienten keine Expression für IL-17A (negativ). In drei Fällen war das Geschlecht der vorliegenden Läsion unbekannt. In 26/135 (19 %) der Fälle konnte ein positiv gefärbtes Begleitinfiltrat der Langerhanszell-Histiozytose beschrieben werden. In 9/135 (6,7 %) der Fälle exprimierten die Langerhanszellen selbst IL-17A.

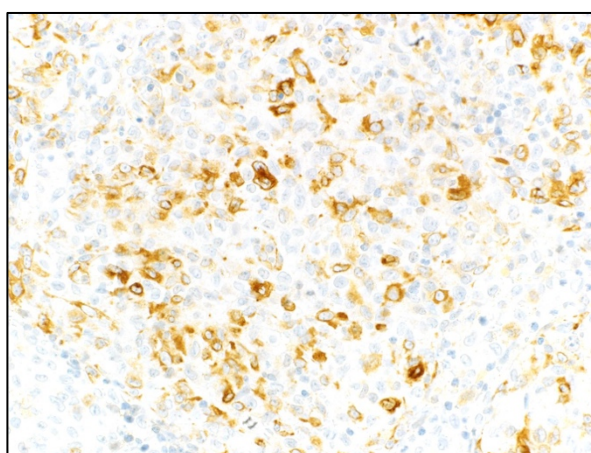


Abbildung 4: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit dem Marker IL-17A. 400-fache Vergrößerung einer kindlichen Langerhanszell- Histiozytose mit Expression von IL17A sowohl im entzündlichen Begleitinfiltrat als auch in den Langerhanszellen selbst.

Geschlecht	IL-17A			Total
	negativ	positives Begleitinfiltrat	positive Langerhanszellen	
männlich	63	18	6	87
weiblich	34	8	3	45
Total	100	26	9	135

Tabelle 13: Übersicht der immunhistochemischen IL-17A-Expression

Für 37 Fälle war die klinische Ausprägung und der immunhistochemische IL-17A-Status bekannt. Mit 26/37 (70 %) exprimierte der überwiegende Anteil kein IL-17A. Bei 9/35 (25,7%) Fällen mit bekannter klinischer Präsentation zeigte sich eine Expression im entzündlichen Begleitinfiltrat der LCH. Lediglich bei 2/37 (5,4%) Fällen zeigte sich eine Expression von IL-17A in den Langerhanszellen. Beides waren Fälle mit einer bekannten MS-LCH (s. Tabelle 14). Mit

dem Freeman-Halton-Test, einer Erweiterung des Exakten Test nach Fisher, konnte das Auftreten der IL-17A-Expression mit der klinischen Präsentation verglichen werden. Die Berechnung ergab einen p-Wert von 0.131. Die immunhistochemische Expression und die Krankheitspräsentation treten somit unabhängig voneinander auf.

Krankheitsausprägung	IL-17A			Total
	negativ	positives Begleitinfiltrat	positive Langerhanszellen	
SS- LCH	18	7	0	25
MS- LCH	8	2	2	12
Total	26	9	2	37

Tabelle 14: Immunhistochemische IL-17A-Expression und die klinische Präsentation

3.2.3 Immunhistochemischer SH-PTP1-Nachweis

Insgesamt konnten 125 Fälle der immunhistochemischen Färbung SH-PTP1 ausgewertet werden. Die Beurteilung der Färbung wird anhand der im Kapitel 2.5.1 aufgeführten Kriterien durchgeführt. In sieben Fälle (7/125) war kein Langerhanszell-Histiozytosematerial in der Stanze vorhanden. Von den restlichen 118 Fällen zeigten alle (118/118) eine über 30-prozentige spezifische Expression von SH-PTP1. Dementsprechend waren alle Läsionen als SH-PTP1 positiv zu werten.

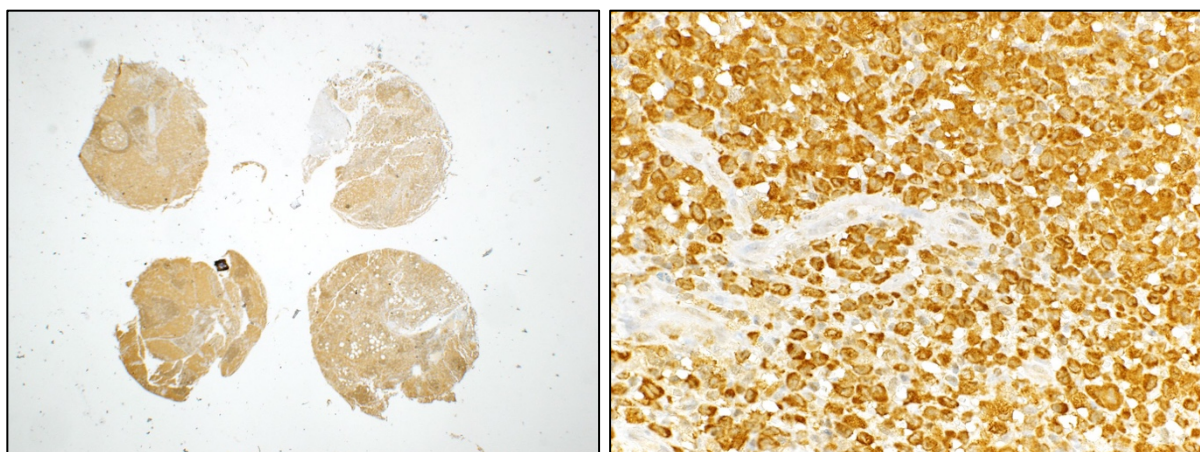


Abbildung 5: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit dem Marker SH-PTP1. Links: Vier Tissue Microarrays kindlicher LCH mit positiver Färbung für den Marker SH-PTP1. Rechts: 400-fache Vergrößerung einer kindlichen LCH mit deutlicher Färbung des Markers SH-PT.

3.2.4 Immunhistochemischer ALKD5F3-Nachweis

Insgesamt konnten 126 Fälle der immunhistochemischen Färbung ALKD3F5 ausgewertet werden. Die Beurteilung der Färbung wird anhand der im Kapitel 2.5.1 aufgeführten Kriterien durchgeführt. Dabei zeigte sich in keiner (0/126) Stanze eine Expression. ALKD3F5 ist somit in 100 % der Fälle negativ.

3.2.5 Immunhistochemischer PD-L1-Nachweis

Die Beurteilung der Färbung wird anhand der im Kapitel 2.5.1 aufgeführten Kriterien durchgeführt.

PD-L1 (Klon 130021): Insgesamt konnten 86 Fälle der immunhistochemischen Färbung PD-L1 der Firma R+D (Klon 130021) ausgewertet werden. In 48 von 86 Fällen (55,8 %) fand sich eine positive Expression für den Marker. In 38 von 86 Fällen (44,2 %) war keine Expression nachzuweisen. Es zeigten sich für den Klon 130021 25/86 (29,1 %) der Fälle im Bereich der niedrigen Expression zwischen 1-29 % spezifischer Färbung der Tumorzellen. Aufgrund des Schwellenwertes von 30 % wurden diese jedoch als negativ gewertet.

PD-L1 (Klon E1L3N): Insgesamt konnten 66 Fälle der immunhistochemischen Färbung PD-L1 der Firma CellSignaling (Klon E1L3N) ausgewertet werden. In 2 von 66 Fällen (3 %) war die Expression für den Marker positiv und in 64 von 66 Fällen (97 %) gilt die PD-L1 Expression als negativ. Der relativ hohe Schwellenwert von 30% für die spezifische Färbung der Tumorzellen, führte dazu, dass sich bei dem Klon E1L3N 7/66 (10,6 %) im Bereich der niedrigen Expression zwischen 1-29 % spezifischer Färbung der Tumorzellen befanden und deshalb als negativ gewertet wurden.

Konkordanz der beiden Klone: Bereits in der Übersicht zeigen sich für das gleiche Kollektiv unterschiedliche Ergebnisse in der Expression der beiden PD-L1 Klone. Die Konkordanz lässt sich mittels des Cohen Kappa berechnen. Zwischen dem Klon von R+D und CellSignaling ergibt sich ein Kappa-Wert von 0,042 (p-Wert: 0,509). Dies entspricht in der Einteilung nach Altman einer schwachen Konkordanz (<0,20) (Altman, 1991). In dem untersuchten Kollektiv zeigt sich somit keinerlei Konkordanz zwischen den beiden untersuchten PD-L1 Klonen.

	PD-L1					
	negativ		positiv		Total	
Geschlecht	R+D	CS	R+D	CS	R+D	CS
männlich	27	43	31	1	58	44
weiblich	10	20	17	1	27	21
unbekannt	1	1	0	0	1	1
Total	38	64	48	2	86	66

Tabelle 15: Übersicht der immunhistochemischen PD-L1 Expression

PD-L1 und die klinische Ausprägung: Das Expressionsmuster von PD-L1 und der klinischen Präsentation der LCH ist in Tabelle 16 dargestellt. Mit dem Exakten Test nach Fisher lässt sich berechnen, dass kein Zusammenhang der PD-L1-Expression von R+D (Klon 130021) und der klinischen Präsentation der Erkrankung besteht ($p= 1$). Für den PD-L1 Antikörper von CellSignaling (Klon E1L3N) wird ebenfalls ein p-Wert von 1 berechnet. Die Expression von PD-L1 mit dem Antikörper von CellSignaling und die klinische Ausprägung treten damit unabhängig voneinander auf. Es kann somit weder für den Antikörper von R+D, noch für den Antikörper von CellSignaling ein Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und der klinischen Ausprägung der LCH nachgewiesen werden.

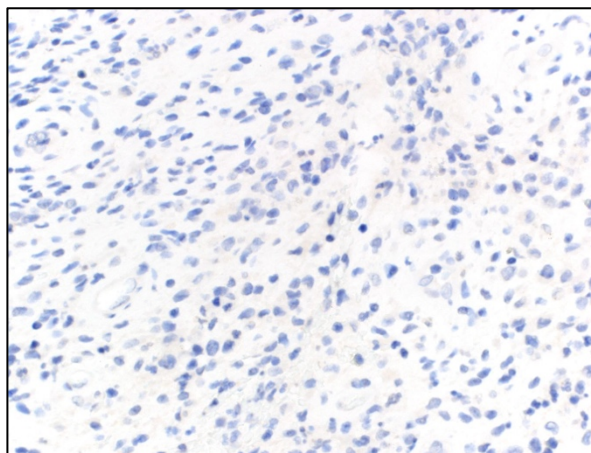


Abbildung 6: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit dem Marker ALKD5F3. Kindliche LCH in 400-facher Vergrößerung ohne Nachweis einer Expression des Markers ALKD5F3.

	PD-L1 (R+D: Klon 130021)		
Krankheitsausprägung	negativ	positiv	Total
SS-LCH	5	11	16
MS- LCH	3	5	8
Total	8	16	24

Tabelle 16: Immunhistochemische PD-L1-Expression (Klon 130021) und klinische Präsentation

	PD-L1 (CellSignaling: Klon E1L3N)		
Krankheitsausprägung	negativ	positiv	Total
SS-LCH	10	0	10
MS- LCH	6	0	6
Total	16	0	16

Tabelle 17: Immunhistochemische PD-L1-Expression (Klon E1L3N) und klinische Präsentation

3.2.6 Immunhistochemischer *BRAFV600E*-Nachweis

Es konnten insgesamt 135 Fälle der immunhistochemischen Färbung BRAF V600E beurteilt werden. Die Beurteilung der Färbung wird anhand der im Kapitel 2.5.1 aufgeführten Kriterien durchgeführt. Insgesamt waren von den 135 Fällen 39 (28,9 %) BRAF-positiv und 96/135 (71,1 %) BRAF- negativ. Das mediane Alter bei Ersterkrankung lag bei den BRAF-negativen Fällen bei 6,2 Jahren (Mittelwert: 7,7 Jahre). Für die BRAF-positiven Fälle lag das mediane Alter bei Ersterkrankung bei 6,5 Jahren (Mittelwert: 6,9). Mit dem Mann-Whitney-U-Test lassen sich die Altersverteilungen in den einzelnen Gruppen vergleichen. Bei einem berechneten p-Wert von 0,944 lässt sich in der hier untersuchten Kohorte kein Zusammenhang zwischen einer BRAF-Expression und dem Erkrankungsalter nachweisen.

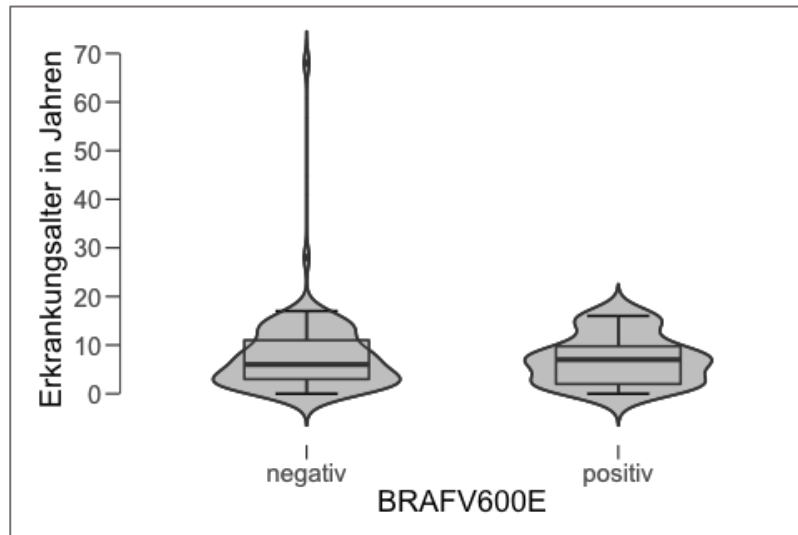


Abbildung 7: Box-Whisker- und Violin-Plot zur Altersverteilung der BRAF-Expression. Das Erkrankungsalter zeigt keinen signifikanten Altersunterschied der immunhistochemischen BRAF-Expression in den beiden Gruppen ($p=0,944$).

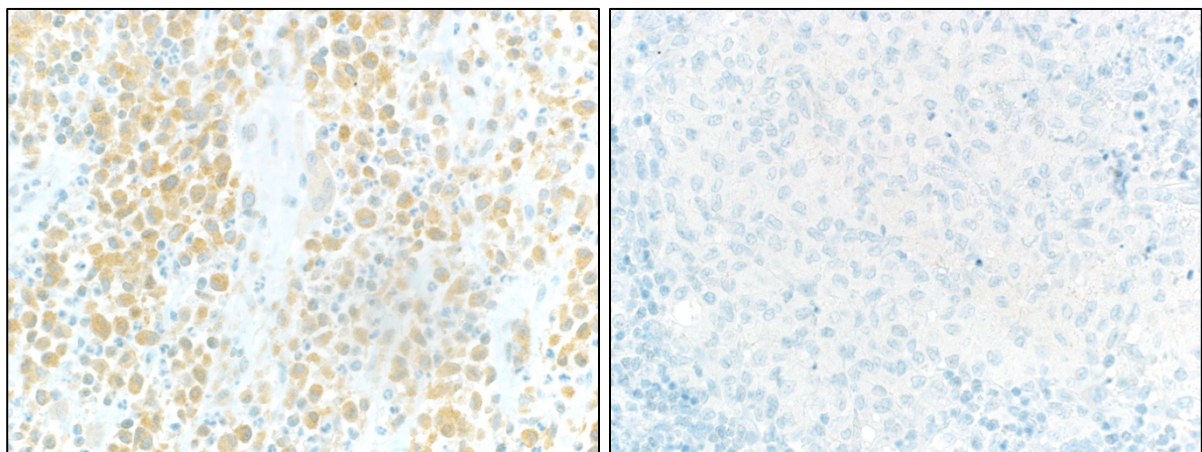


Abbildung 8: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung mit dem Marker BRAFV600E (400-fache Vergrößerung). Links: Kindliche LCH ohne Nachweis einer BRAF-Expression in den Langerhanszellen. Rechts: Kindliche LCH mit einer Expression von BRAFV600E in über 30% der Langerhanszellen.

3.2.7 Molekulare Auswertung des *MAP2K1*- Mutationsstatus

Insgesamt gab es von 59/96 immunhistochemisch bestimmten *BRAF*-Wildtypen noch ausreichend LCH-Material, um eine *MAP2K1*-Diagnostik durchzuführen. 12 Proben wurden von der Analyse ausgeschlossen, da die vorhandene DNA nicht für die Mutationsanalyse ausreichte oder das PCR-Produkt verunreinigt war. Es konnten also 47 Fälle mit dem immunhistochemisch suggerierten *BRAF*-Wildtyp auf eine Mutation im Exon 2 und Exon 3 des *MAP2K1*-Gens untersucht werden. Dabei wurde von den 47 Fällen bei insgesamt elf Fällen (23,4 %) eine Mutation gefunden. Der mediane des Erkrankungsalters lag bei den Kindern mit einer Mutation bei 7,3 Jahren (Mittelwert: 7,5 Jahre). Der Median des Erkrankungsalters bei Kindern ohne *MAP2K1*- Mutation lag bei 8,1 Jahren (Mittelwert: 8,9 Jahre). Mit dem Mann-Whitney-U-Test lassen sich die Altersverteilungen in den einzelnen Gruppen mit einer nachgewiesenen *MAP2K1*- Mutation oder mit dem *MAP2K1*-Wildtyp vergleichen. Die Altersverteilung zeigt in dem hier untersuchten Kollektiv keinen Zusammenhang mit dem *MAP2K1*- Mutationsstatus ($p= 0,845$).

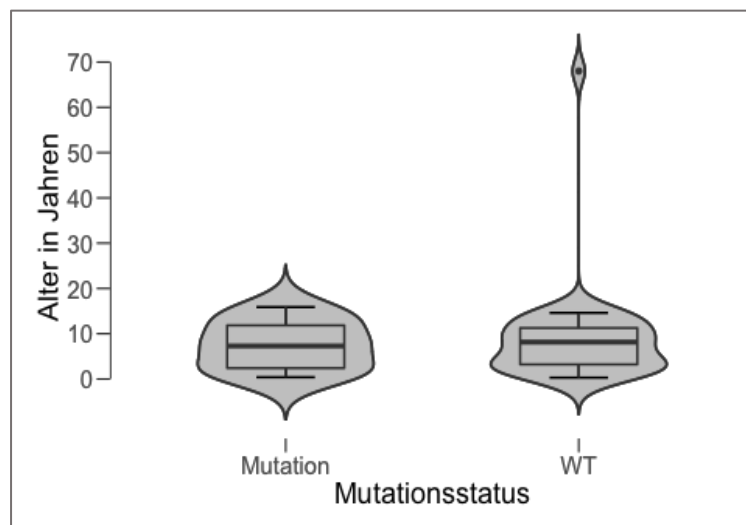


Abbildung 9: Box-Whisker- und Violin-Plot zur Altersverteilung der *MAP2K1*-Mutation. Das Erkrankungsalter zeigt keinen signifikanten Altersunterschied in den Gruppen mit *MAP2K1*-Mutation oder einem *MAP2K1*-Wildtyp.

Bei drei in dieser Arbeit nachgewiesene Mutationen handelt es sich um Erstbeschreibungen im Zusammenhang mit dem *MAP2K1*-Gen. Bei allen Mutationen handelt es sich um in-frame Deletionen zwischen fünf und 38 Basen. In drei Fällen kam es zur Deletion von 14 Basen im Exon 2 (c.159_173del; p.F53_Q58 del ins L), in drei weiteren Fällen kam es an anderer Stelle im Exon 2 zur Deletion von 14 Basen (c.173_187del; p.Q58_E62 del). Drei Mutationen im Exon 2 konnten einmalig nachgewiesen werden (c.120_158del; p.E41_F57 del; c.165-179del

(p.Q56-V60del); c.168_182 del; p.K57_G61 del). Im Exon 3 zeigten sich zwei verschiedene Deletionen (c.303_308del; p.E102_I103 del; c.301_307del ins T; p.L101_I103del ins F). Bei drei der in dieser Arbeit beschriebenen Mutationen handelt es sich um Mutations-Erstbeschreibungen im Zusammenhang mit Langerhanszell-Histiozytosen (c.120_158del; p.E41_F57 del; c.165-179del; p.Q56-V60del; p.L101_I103del ins F). Vier weitere der nachgewiesene Mutationen sind in der Literatur bereits bei Langerhanszell-Histiozytosen vorbeschrieben (c.173_187del; p.Q58_E62 del; c.301_307del ins T; c.159_173del; p.F53_Q58 del ins L, c.303_308del; p.E102_I103 del, c.168_182 del; p.K57_G61 del) (Quelle: www.cancer.sanger.ac.uk; Brown et al., 2014). In 36 von den 59 Fällen (76,6 %) konnte keine Mutation nachgewiesen werden.

Fall	Exon	MAP2K1-Mutation	SS/MS- LCH
1	Ex 2	c.159_173del; p.F53_Q58 del ins L	Nicht bekannt
2	Ex 2	c.120_158del; p.E41_F57 del	Nicht bekannt
3	Ex 3	c.303_308del; p.E102_I103 del	Nicht bekannt
4	Ex 2	c.165-179del; p.Q56-V60del	SS
5	Ex 2	c.159_173del; p.F53_Q58 del ins L	MS
6	Ex 2	c.173_187del; p.Q58_E62 del	Nicht bekannt
7	Ex 2	c.159_173del; p.F53_Q58 del ins L	SS
8	Ex 2	c.168_182 del; p.K57_G61 del	Nicht bekannt
9	Ex 2	c.173_187del; p.Q58_E62 del	SS
10	Ex 2	c.173_187del; p.Q58_E62 del	SS
11	Ex 3	c.301_307del ins T; p.L101_I103del ins F	SS

Tabelle 18: Übersicht der molekular nachgewiesenen MAP2K1-Mutationen

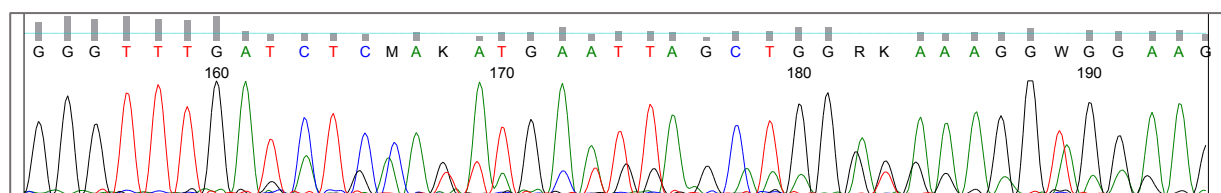


Abbildung 10: Beispiel einer MAP2K1-Mutation (c.303_308del; p.E102_I103 del im Exon3)

3.3 Korrelation des immunhistochemischen *BRAF*-Mutationsstatus mit der klinischen Präsentation

Um eine mögliche Unabhängigkeit zwischen der BRAFV600E-Expression und der Krankheitsausprägung (SS-LCH oder MS-LCH) zu testen, wurde der Exakte Test nach Fisher angewendet. Für 34 Fälle waren sowohl der Systembefall als auch die immunhistochemische Expression für BRAFV600E bekannt. Der berechnete p-Wert beträgt 0,7041. Die Nullhypothese „SS- und MS- Befall treten unabhängig vom BRAFV600E-Status auf“ wird bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ nicht verworfen. Es kann damit für diese Stichprobe keine signifikante Abhängigkeit der klinischen Ausprägung vom BRAF-Expressionsprofil festgestellt werden.

Krankheitsausprägung	BRAFV600E		
	negativ	positiv	Total
SS-LCH	15	9	24
MS-LCH	5	5	10
Total	20	14	34

Tabelle 19: Tabelle 19: Immunhistochemische BRAF-Expression und klinische Präsentation

3.3.1 Korrelation des immunhistochemischen *BRAF*-Mutationsstatus und der PD-L1-Expression

Es soll ein möglicher Zusammenhang zwischen einer immunhistochemischen BRAFV600E- und der PD-L1-Expression getestet werden. Hierzu wurde der Exakte Test nach Fisher benutzt.

PD-L1 (Klon 130021): Für die Färbung mit dem Antikörper von R+D kann ein p-Wert von 1 berechnet werden. Damit wird die Nullhypothese „PD-L1 (Klon 130021) Färbeintensivität und BRAFV600E-Status sind unabhängig voneinander“ nicht verworfen. Es kann kein Zusammenhang der Daten innerhalb dieser Stichprobe nachgewiesen werden

PD-L1 (Klon 130021)	BRAFV600E		
	negativ	positiv	Total
positiv	29	16	45
negativ	24	13	37
Total	53	29	82

Tabelle 20: Immunhistochemische BRAF- und PD-L1-Expression (Klon 130021)

PD-L1 (Klon E1L3N): Für die Färbung mit dem Antikörper von CellSignaling kann ein p-Wert von 0.5152 berechnet werden. Damit wird die Nullhypothese „PD-L1 (Klon E1L3N) Färbeintensivität und BRAFV600E-Status sind unabhängig voneinander“ nicht verworfen. Es kann auch bei diesem Antikörper kein Zusammenhang der Daten innerhalb dieser Stichprobe nachgewiesen werden.

	BRAFV600E		
PD-L1 (Klon E1L3N)	negativ	positiv	Total
positiv	2	0	2
negativ	38	26	64
Total	40	26	66

Tabelle 21: Immunhistochemische BRAF- und PD-L1-Expression (Klon E1L3N)

3.4 Korrelation des molekularen *MAP2K1*-Mutationsstatus mit der klinischen Präsentation

Um eine mögliche Unabhängigkeit zwischen der *MAP2K1*-Mutation und der klinischen Krankheitsausprägung (SS-LCH oder MS-LCH) zu testen, wurde der Exakte Test nach Fisher angewendet. Für 18 Fälle waren sowohl der Systembefall als auch der *MAP2K1*-Mutationsstatus bekannt. Der berechnete p-Wert beträgt 0.6148. Die Nullhypothese „SS- und MS- Befall treten unabhängig vom *MAP2K1*-Status auf“ wird bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ nicht verworfen. Es kann damit für diese Stichprobe keine signifikante Abhängigkeit der klinischen Ausprägung vom *MAP2K1*-Mutationstatus festgestellt werden.

	<i>MAP2K1</i> -Mutationsstatus		
Krankheitsausprägung	negativ	positiv	Total
SS-LCH	8	5	13
MS-LCH	4	1	5
Total	12	6	18

Tabelle 22: MAP2K1-Mutationsstatus und klinische Präsentation

3.5 Korrelation des molekularen *MAP2K1*-Mutationsstatus mit der immunhistochemischen PD-L1 Expression

Es soll ein möglicher Zusammenhang zwischen einer *MAP2K1*-Mutation und der immunhistochemischen Ausprägung von PD-L1 untersucht werden. Hierzu wurde der Exakte Test nach Fisher mit einem Signifikanzniveau von 0,05 angewandt, da in einigen Spalten $n < 5$ ist und mehr als zwei Variablen berücksichtigt werden.

PD-L1 (Klon 130021): Für die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper von R+D kann ein p-Wert von 0.3748 berechnet werden. Damit wird die Nullhypothese „PD-L1 (Klon 130021) Färbeintensivität und *MAP2K1*-Status sind unabhängig voneinander“ nicht verworfen. Es kann kein Zusammenhang der Daten innerhalb dieser Stichprobe nachgewiesen werden.

	<i>MAP2K1</i> -Mutationsstatus		
PD-L1 (Klon 130021)	negativ	positiv	Total
negativ	7	1	8
positiv	12	6	18
Total	19	7	26

Tabelle 23: *MAP2K1*-Mutationsstatus und immunhistochemische PD-L1-Expression (Klon 130021)

PD-L1 (Klon E1L3N): Für die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper von CellSignaling kann ein p-Wert von 1 berechnet werden. Damit wird die Nullhypothese „PD-L1 (Klon E1L3N) Färbeintensivität und *MAP2K1*-Status sind unabhängig voneinander“ nicht verworfen. Es kann auch bei diesem Antikörper kein Zusammenhang der Daten innerhalb dieser Stichprobe nachgewiesen werden.

	<i>MAP2K1</i> -Mutationsstatus		
PD-L1 (Klon E1L3N)	negativ	positiv	Total
negativ	12	4	16
positiv	2	0	2
Total	14	4	18

Tabelle 24: *MAP2K1*-Mutationsstatus und immunhistochemische PD-L1-Expression (Klon E1L3N)

4 Diskussion

Die Langerhanszell-Histiozytose ist eine seltene Erkrankung, deren klinische Präsentation und Verlauf sehr variabel ist. Ein Teil der Erkrankungen ist auch heute noch letal. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Ausprägungen und die Krankheitsentstehung im Allgemeinen sind bis heute noch nicht vollständig geklärt und erschweren die leitliniengerechte Therapie der Erkrankung. Basierend auf den aktuellen Forschungsergebnissen wird eine klonale, neoplastische Expression von Langerhanszellen angenommen.

In dieser Arbeit wurden zunächst an einem großen pädiatrischen Patientenkollektiv die immunhistochemischen Antikörper IL-17A, SH-PTP1, ALKD3F5 und PD-L1 getestet, um ihre mögliche Rolle für die immunhistochemische Diagnostik der Erkrankung zu untersuchen. Außerdem wurde das Patientenkollektiv über den immunhistochemischen Surrogatmarker auf eine *BRAFV600E*-Mutation untersucht. Zusätzlich wurde an den immunhistochemisch bestimmten *BRAF*-Wildtypen eine Sanger-Sequenzierung der Exons 2 und 3 zur Detektion von Mutationen im *MAP2K1*-Gen durchgeführt. Die Fälle, bei denen klinische Daten zur systemischen Ausbreitung der Erkrankung bekannt waren, wurden hinsichtlich der Zusammenhänge ihrer klinischen Erscheinung und des Mutationsstatus untersucht. Die vorliegende Arbeit zeichnet sich im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten mit Bezug zur bearbeiteten Thematik vor allem durch das größte (n=145) je untersuchte Kollektiv an rein kindlichen Langerhanszell-Histiozytosen aus.

4.1 Immunhistochemische Färbungen

In dieser Arbeit wurden die immunhistochemischen Antikörper IL-17A, PD-L1, SH-PTP und ALKD5F3 an einem großen Patientenkollektiv mit bekannter Langerhanszell-Histiozytose untersucht.

SH-PTP-1: Murakami et al. konnten 2011 eine Überexpression von SH-PTP-1 in der Immunhistochemie von Langerhanszell-Histiozytosen feststellen. Eine Beschreibung der Altersverteilung der untersuchten Fälle ist der Arbeit nicht zu entnehmen. Dabei zeigte sich bei 21 SS-LCH und 12 MS-LCH eine signifikant stärkere Expression von SH-PTP1 in multisystemischen LCH. Murakami et al. schlussfolgerten, dass SH-PTP1 als möglicher prognostischer Marker in der LCH-Diagnostik eingesetzt werden kann (Murakami et al., 2011). 2015 präsentierte die Arbeitsgruppe aufgrund dieser Ergebnisse ein neues Entstehungsmodell der LCH, wobei es sich bei der LCH um eine entzündliche Erkrankung handele, die durch Mutationen im MEK/ERK-Signalweg verstärkt wird (Murakami et al., 2015 a). Eine wichtige

Rolle zur Triggerung dieser Entzündung spiele der Merkelzell Polyomavirus (MCPyV), der die Zellen mit BRAF-Mutationen zur Zytokinfreisetzung stimuliert (Murakami et al., 2015 b).

In dieser Arbeit zeigten alle 125 Langerhanszell-Histiozytosen eine über 30-prozentige spezifische Expression von SH-PTP1 in der immunhistochemischen Färbung und wurden somit alle als positiv für die Färbung gewertet. Eine mögliche Korrelation zwischen der Krankheitsausprägung und der Stärke der SH-PTP-1-Expression konnte nicht nachgewiesen werden, da sich keine Unterschiede in der Expression zeigten. Den in dieser Arbeit erhobenen Daten zufolge, lässt sich die Hypothese „SH-PTP1 als prognostischer Marker in der LCH-Diagnostik“ nicht bestätigen. Der publizierte Marker zeigt sich unseren Ergebnisse zufolge als ungeeignet. Es wurde der Antikörper desselben Herstellers in vergleichbarer Verdünnung wie von Murakami et al. verwendet. Trotz wiederholter Färbungen und verschiedener Verdünnungen konnten die Daten in dieser Arbeit nicht verifiziert werden. SH-PTP1 als immunhistochemischer Marker für die Diagnostik und Prognose der kindlichen Langerhanszell-Histiozytose scheint zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Rolle zu spielen.

ALKD5F3: Die Literaturdaten zeigen, dass die immunhistochemischen und niedermolekularen Nachweismethoden des ALK-Fusionsproteins eine hohe Konkordanz aufweisen und die Immunhistochemie durchaus geeignet scheint, um Fusionsproteine zu detektieren (Perkins et al., 2005; Ali et al., 2014). Der molekulare Nachweis einer Fusion der Anaplastischen Lymphomkinase mit der N-terminalen Domäne KIF5B und die damit verbundene Aktivierung des ERK-Signalweges gelang 2016 in zwei Histiozytosen vom Nicht-LCH-Typ (Diamond et al., 2016). Eine Translokation von *ALKD5F3* bei Histiozytosen vom Langerhanszell-Typ wurde bisher noch nicht beschrieben. Der Nachweis einer ALK-Fusion bei LCH würde für die Targeted Therapie mit ALK Inhibitoren eine entscheidende Rolle in der Behandlung der LCH spielen.

In der hier durchgeführten immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper ALKD3F5, konnten in keiner Langerhanszell-Histiozytose eine Expression des Markers beobachtet werden. Damit konnten immunhistochemisch keine Fusionsproteine nachgewiesen werden. Alle bis dato beschriebenen Translokationen im *ALKD5F3*-Gen sind bei Histiozytosen vom Nicht-LCH-Typ (Erdheim-Chester-Disease) nachgewiesen worden. Eine Korrelation der Surrogatmarker mit molekularen Alterationen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die immunhistochemischen und niedermolekularen Nachweise von *ALK*-Translokationen eine hohe Konkordanz aufweisen (Perkins et al., 2005; Ali et al., 2014). Es ist also davon auszugehen, dass sich unter den 126 Fällen von kindlichen

Langerhanszell-Histiozytosen tatsächlich keine *ALK*-Alterationen befinden. Aufgrund dieser Ergebnisse postulieren wir, dass eine Dysregulation der Anaplastischen Lymphomkinase bei dieser Tumorentität keine wesentliche Rolle spielt und daher auch nicht als Therapietarget in Frage kommt. Da bereits *ALK*-Alterationen bei Histiozytosen vom Nicht-Langerhanszell-Typ nachgewiesen wurden, ist es möglich, dass Alterationen bei anderen Histiozytosen durchaus eine entscheidende Rolle spielen.

IL-17A: Über den Nachweis von IL-17A bei Langerhanszell-Histiozytosen gibt es bisher nur wenige veröffentlichte Arbeiten. Coury et al. wiesen 2008 erstmalig erhöhte IL-17A Titer im Plasma von LCH-Patienten nach und konnten gleichzeitig per Immunfluoreszenz die Synthese von IL17A in den dendritischen Zellen der LCH beobachten. Mehrere Studien widerlegten diese These jedoch. Sie konnten erhöhte IL-17A Titer weder in Langerhanszellen, noch im entzündlichen Infiltrat der LCH nachweisen (Coury et al., 2008; Allen et al., 2009; Peters et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche IL-17A-Expression mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden.

In dieser Studie wurde ein Kollektiv von 135 kindlichen LCH mittels Immunhistochemie untersucht. Darin zeigten sich morphologische Unterschiede in der IL-17A-Expression. Während in einem Teil der Tumoren eine IL-17A-Expression lediglich im entzündlichen Begleitinfiltrat der Läsionen detektiert werden konnte, zeigte einzelne Läsionen eine Expression von IL-17A in den Langerhanszellen. Insgesamt exprimierten mehr als 25 % der hier untersuchten Fälle IL-17A in den LCH-Läsionen. Allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der IL-17A Expression zwischen der SS-LCH und der MS-LCH. Da jedoch nur für 37 Fälle die klinische Ausprägung der Erkrankung bekannt war, ließen sich keine validen Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen der IL-17A Expression und der Krankheitsausprägung treffen. Die entzündliche oder genetische Ätiologie der Überexpression ließ sich in der Immunhistochemie ebenfalls nicht näher untersuchen. Es bedarf weiterer niedermolekularer Nachweismethoden für die Fälle mit immunhistochemischer IL-17A Überexpression. Insbesondere auch, um klar zu differenzieren, ob die IL-17A-Expression im Rahmen des entzündlichen Begleitinfiltrates zu werten, oder tatsächlich an der Pathogenese der LCH beteiligt ist.

Es lässt sich zusammenfassen, dass IL-17A in einem Teil der Langerhanszell-Histiozytosen exprimiert wird. Die Expression des Markers, basierend auf den hier erhobenen Daten, korreliert jedoch nicht mit der klinischen Ausprägung der Erkrankung. Zur möglichen

Diagnostik der Erkrankung ist die Immunhistochemie mittels IL-17A bis dato noch nicht einsatzfähig. Ließe sich in Zukunft ein Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung und der Immunhistochemie nachweisen, sollte dies jedoch weiterführend untersucht werden.

PD-L1: Therapieoptionen für PD-L1 positive Tumoren mit immunreaktiver Komponente rückten in neuester Zeit immer mehr in den Fokus der Forschung. Vor allem Tumoren, die immunhistochemisch positiv für PD-L1 sind, zeigten in Studien ein besonders gutes Ansprechen auf PD-L1-Antikörper (Nivolumab) (Taube et al., 2014). Xu et al. konnten bei 20 % der Langerhanszell-Histiozytosen eine immunhistochemische PD-L1 Expression nachweisen. Dabei färbte sich jedoch das entzündliche Begleitinfiltrat. Die Langerhanszelle selbst exprimierte kein PD-L1 (Xu et al., 2016).

In dieser Arbeit wurden die Antikörper zwei verschiedener Klone parallel am gleichen Patientenkollektiv getestet. Es zeigten sich dabei stark voneinander abweichende Ergebnisse. Schlussfolgernd lässt sich konkludieren, dass zwischen der Expression der beiden Marker keine Konkordanz bestand. Die hier beschriebene Beobachtung der ausgeprägten Divergenz im Färbeverhalten der einzelnen Marker ist bereits in kleinerem Ausmaß von anderen Autoren beschrieben worden. Dies sei darauf zurückzuführen, dass jeder Marker auf eine mögliche Therapiesubstanz optimiert wurde (Scheel et al., 2016; Rimm et al., 2017). Dennoch erschwert die fehlende Konkordanz die Interpretation der Ergebnisse. Für den Antikörper von R+D (Klon 130021) wurde eine Expression von PD-L1 in 48/86 (55,8 %) Fällen des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs nachgewiesen. Der CellSignaling (Klon E1L3N) Antikörper konnte in nur 2/66 (3 %) Tumoren eine Expression detektieren. Statistisch betrachtet zeigte sich zwischen den zwei verschiedenen Klonen keinerlei Konkordanz im Expressionsprofil. Für den Klon der Firma CellSignaling (E1L3N) ist bereits eine deutlich geringere Färbeintensität und Sensitivität in der Literatur beschrieben (Smith et al., 2016).

Auch die mikroskopische Auswertung der Färbungen gestaltete sich schwierig, da sich teilweise das Begleitinfiltrat der LH-Zellen ebenfalls mitfärbte und eine sichere Abgrenzung nicht immer gewährleistet war. In der Annahme also, dass PD-L1 auch in physiologischen Zellen exprimiert wird, wurde der relativ hohe Positiv-Schwellenwert von 30 % spezifisch gefärbter Tumorzellen gewählt. Es zeigten sich bei dem Klon E1L3N durchaus 7/66 (10,6 %) im Bereich der niedrigen Expression zwischen 1-29 % spezifischer Färbung der Tumorzellen. Für den Antikörper von R+D waren es immerhin 25/86 (29,1 %). Aufgrund des Schwellenwertes wurden diese Fälle jedoch insgesamt als negativ gewertet. Die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen PD-L1-Antikörper weisen auf die Schwierigkeit der

Deutung von PD-L1 als Biomarker hin.

Anders als von Zeng et al. beschrieben, konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem *BRAF*-Status nachgewiesen werden (Zeng et al., 2016). Auch für die Expression von PD-L1 und dem MAP2K1-Mutationsstatus zeigten sich in diesem untersuchten Kollektiv keine Zusammenhänge.

Trotz der fehlenden Konkordanz der Antikörper lässt sich feststellen, dass auch in dem hier untersuchten Kollektiv an kindlichen Langerhanszell-Histiozytosen PD-L1 in einem Teil der LCH nachgewiesen werden kann. Vor allem für die therapierefraktären Fälle wäre es denkbar, dass der PD-L1-Pathway als möglicher Therapietarget in Frage kommt. Zeng et al. beschrieben 2016 einen Zusammenhang zwischen *BRAF*-positiven LCH und der PD-L1 Expression (Zeng et al., 2016). Es zeigte sich in dieser Arbeit weder für den Antikörper von CellSignaling, noch von R+D einen Zusammenhang mit dem *BRAF*-Mutationsstatus.

BRAFV600E: Mutationen des Protoonkogens *BRAF* konnten in den letzten Jahren in vielen verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Peyssonnaud & Eyche`ne, 2001; Davies et al., 2002). Die Entdeckung der *BRAF*-Mutation in Langerhanszell-Histiozytosen klassifizierte die LCH erstmalig als neoplastische Erkrankung (Badalian-Very et al., 2010) und war ein bahnbrechender Erfolg in der Entstehungstheorie der Erkrankung.

Insgesamt waren 29 % der hier untersuchten kindlichen LCH Fälle in der Immunhistochemie *BRAF*-positiv. In der Literatur gibt es Angaben, die von 16-69 % *BRAF*-Mutationen bei untersuchten Langerhanszell-Histiozytosen reichen (Badalian-Very et al., 2010; Satoh et al., 2012; Sahm et al., 2012; Haroche et al., 2012; Alayed et al., 2016). Die hier erhobenen Werte liegen in der Gesamtschau deutlich unter den Prozentzahlen anderer Studien. Die Ursache dieser Diskrepanz bleibt ungewiss. Ein möglicher Erklärungsansatz kann die in dieser Arbeit verwendete Methodik sein. Zwar zeigte sich die Immunhistochemie für *BRAF*-Mutationen in vorherigen Studien als zuverlässig (Zeng et al., 2016), dennoch konnten in einigen Arbeiten bei fehlender immunhistochemischer Expression eine *BRAF*-Mutation in der Pyrosequenzierung nachgewiesen werden (Roden et al., 2014; Alayed et al., 2016). Es muss also angenommen werden, dass die tatsächliche Anzahl an *BRAF*-Mutationen höher ist, als diesem Kollektiv detektiert. Den in dieser Arbeit erhobenen Daten folgend, wird angenommen, dass BRAFV600E kein verlässlicher Surrogatmarker für eine Mutation darzustellen scheint. Der dafür erforderliche Korrelationsnachweis der Immunhistochemie mit der Molekularpathologie wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht bearbeitet.

Möglichweise ist die Anzahl an *BRAF*-Mutationen in kindlichen Langerhanszell-Histiozytosen auch niedriger als in den bisher untersuchten Kollektiven gemischten Alters.

Bisher konnte kein klarer Zusammenhang zwischen dem *BRAF*-Mutationsstatus und der klinischen Präsentation der Erkrankung festgestellt werden. Badalian-Very et al. konnten in ihren Untersuchungen eine Korrelation zwischen *BRAF*-positiven Tumoren und geringerem Durchschnittsalter bei Erkrankung feststellen (Badalian-Very et al., 2010). In den hier untersuchten Fällen bildet sich ein solcher Trend nicht ab. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsalter bei Erstdiagnose und der *BRAF*-Expression in der Immunhistochemie. Bis heute konnten somit keine diagnostischen Marker der LCH ausfindig gemacht werden, die mit dem singlesystemischen- oder multisystemischen Befall korrelieren. In Zukunft sollten mögliche Zusammenhänge nochmals an größeren Kollektiven mittels Pyrosequenzierung getestet werden.

Zusammenfassung: Die Immunhistochemie ermöglichte in dieser Dissertation ein großes Patientenkollektiv an LCH bezüglich der Expression verschiedener Marker zu untersuchen. Für *ALKD5F3* und *SH-PTP1* lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass die durchgeführte Methodik nicht zur Diagnostik der LCH geeignet ist. Vor allem für *ALKD5F3* gilt, dass aufgrund der fehlenden Expression davon auszugehen ist, dass *ALK*-Fusionsproteine nicht an der Entstehung der kindlichen Langerhanszell-Histiozytosen beteiligt zu sein scheint. Für *SH-PTP1* bleibt es ungewiss, warum trotz mehrfacher Versuche keine unterschiedlichen Expressionslevel für die einzelnen Läsionen erreicht werden konnten. *IL-17A* und *PD-L1* scheinen eine noch unbekannte Rolle bei der Pathogenese der Langerhanszell-Histiozytosen zu spielen. In dieser Arbeit ist es gelungen eine Expression beider Mediatoren in einem Teil der LCH nachzuweisen. Einen signifikanten Unterschied zwischen singlesystemischem- bzw. multisystemischen Befall konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die häufig beschriebene *BRAF*-Mutation bei LCH konnte mittels Immunhistochemie bei 29 % der hier untersuchten LCH detektiert werden. Diese Ergebnisse entsprechen einem geringeren Prozentsatz als in vorherige Untersuchungen mittels Sequenzierung beschrieben wurden. Deshalb wird in dieser Arbeit suggeriert, dass der immunhistochemische Marker *BRAFV600E* kein geeigneter Surrogatmarker für den *BRAF*-Mutationsstatus darstellt. Eine Korrelation zwischen der klinischen Präsentation und dem suggerierten *BRAF*-Mutationsstatus ließ sich in dieser Arbeit ebenfalls nicht nachweisen. Dies könnte vermutlich auf den geringen Anteil an Fällen mit klinischen Daten zurückzuführen sein. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass keine der

in dieser Arbeit untersuchten immunhistochemischen Nachweismethoden aktuell zur Routinediagnostik der LCH geeignet ist. Der Nachweis von IL-17A und PD-L1 bei einem Teil des Patientenkollektivs kann in Zukunft jedoch neue Therapieoptionen für Kinder mit einer Langerhanszell-Histiozytose ermöglichen.

4.2 Mutationsauswertung

Für die Entstehung der Langerhanszell-Histiozytosen wurden in den letzten Jahren immer mehr Mutationen entdeckt. Es wurde sich bei dem vorliegenden Kollektiv vor allem auf die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Mutationen im *BRAF*- und *MAP2K1*-Gen konzentriert. Aufgrund des großen Patientenkollektivs und erprobter Methodik erfolgte die Auswertung der *BRAF*-Mutationen mittels Immunhistochemie (s. Kapitel 4.1). Die *MAP2K1*-Mutationsdiagnostik erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung.

4.2.1 Molekulare *MAP2K1*-Mutationsanalyse

Brown et al. entdeckten bei bis zu 50 % der *BRAF*-Wildtypen eine Mutation im *MAP2K1*-Gen (Brown et al., 2014). In dieser Studie wurde in 23,4% (11/47) der immunhistochemischen *BRAF*-Wildtypen eine *MAP2K1*-Mutation detektiert. Bei allen in dieser Arbeit nachgewiesenen Mutationen handelt es sich um in-frame Deletionen im Exon 2 und 3. Vier der nachgewiesenen Deletionen sind bereits in der Literatur bei Langerhanszell-Histiozytosen vorbeschrieben (Chakraborty et al., 2014; Alayed et al., 2016; COSMIC, www.cancer.sanger.ac.uk). Der ausschließliche Nachweis von in-frame Deletionen steht in deutlicher Diskrepanz zu *MAP2K1*-Mutationen anderer Erkrankungen. Bei der Mutationsdatenbank COSMIC machen die in-frame-Deletionen lediglich 9 % aller *MAP2K1*-Mutationen aus. Vor allem Punktmutationen (78 %) konnten bei anderen Erkrankungen im *MAP2K1*-Gen nachgewiesen werden (www.cancer.sanger.ac.uk). Diese Arbeit zeigt jedoch auch, dass das Mutationsspektrum bei kindlichen Langerhanszell-Histiozytosen im *MAP2K1*-Gen vermutlich deutlich breiter ist als bislang vermutet. Es gelang drei weitere bis dato nicht bekannte Mutationen nachzuweisen: c.120_158del; p.E41_F57 del; c.165-179del (p.Q56-V60del) und c.301_307del ins T; p.L101_I103del ins F.

Wird suggeriert, dass die *BRAF*-Immunhistochemie kein guter Surrogatmarker für den Mutationsstatus ist, ist auch weiter untersuchte Kollektiv an *BRAF*-Wildtypen zu hinterfragen. Die möglicherweise zu hohe Anzahl falsch negativer Immunhistochemie erhöht die Anzahl an *BRAF*-negativen Fällen, an denen eine *MAP2K1*-Diagnostik durchgeführt werden kann. Dies kann in dieser Arbeit eine mögliche Ursache der, im Vergleich zu Literaturdaten, geringeren Inzidenz von *MAP2K1*-Mutationen darstellen.

Die aktuelle Studienlage lässt vermuten, dass es noch weitere unbekannte Mutationen im RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweg gibt, die zur Aktivierung der Signalkaskade führen. Badalin et al. konnten unabhängig von den nachgewiesenen Mutationen eine Aktivierung der Signalkaskade

in allen Langerhanszell-Histiozytosen nachweisen (Badalin- Very et al., 2010). Andere Studien zeigten jedoch auch Fälle mit einer MEK-Inaktivierung (Chakraborty et al., 2014). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde keine generelle Aktivierung des Signalweges untersucht. Um die Mutationsergebnisse besser in das Gesamtbild der Forschungsergebnisse einordnen zu können, sollten in Zukunft für alle untersuchten Fälle auch die allgemeine Aktivierung der Signalkaskade mittels immunhistochemischer Färbung mit den Antikörpern Phospho-MEK und Phospho-ERK erfolgen.

Weder für die immunhistochemisch postulierte *BRAF*-Mutation, noch für die molekular nachgewiesenen *MAP2K1*-Mutationen ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem monosystemischen und dem multisystemischen Befall der LCH erkennen. Es kann also von einer Gleichverteilung der Fälle mit und ohne Mutation in den unterschiedlichen klinischen Gruppen gesprochen werden. Die Daten bestätigen damit die aktuelle Datenlage der Literatur. Bis jetzt konnte auch in anderen Studien bei LCH keine Korrelation zwischen dem Mutationsstatus und der klinischen Ausprägung der Erkrankung gezogen werden (Brown et al., 2014). Im Gegensatz zu der *BRAF*-Mutation konnten bei der untersuchten Gruppe auf *MAP2K1*-Mutationen keinen signifikanten Unterschied im Erkrankungsalter nachweisen. Auch der Ätiologie der LCH ohne Nachweis von *BRAF*- oder *MAP2K1*-Mutationen bleibt weiterhin ungewiss. Zwar stand uns ein großes Kollektiv an kindlichen Langerhanszell-Histiozytosen zur Mutationsanalyse zur Verfügung, aber klinische Daten waren nur begrenzt verfügbar. Deshalb können keine validen Rückschlüsse über den weiteren Verlauf oder das Langzeitüberleben der Patienten/innen gezogen werden.

Zusammenfassend konnte auch an einem rein kindlichen Kollektiv die bereits bekannte Mutation im *MAP2K1*-Gen in 23,4% der Fälle nachgewiesen werden. Das Mutationsspektrum scheint dabei mit drei neu detektierten Mutationen deutlich größer als bisher angenommen. Dennoch liegt die Gesamtanzahl an *MAP2K1*-Mutationen unter dem in der Literatur beschriebenen Wert. Ob dies eine Folge der immunhistochemischen *BRAF*-Mutationsdiagnostik ist oder der Wert möglicherweise in kindlichen Langerhanszell-Histiozytosen geringer ist, bleibt jedoch weiterhin ungewiss.

5 Zusammenfassung

Die Langerhanszell-Histiozytose im Kindesalter ist eine klonale, neoplastische Proliferation von dendritischen Zellen, die prinzipiell jedes Organsystem betreffen kann. Histologisch zeigen sich Langerhans-Zellnester mit entzündlichem Begleitinfiltrat. Das Befallsmuster der Erkrankung lässt sich in monosystemische Erkrankungen (SS-LCH), mit dem Befall eines Organsystems, und in multisystemische Erkrankungen (MS-LCH), mit dem Befall mehrerer Organsysteme, einteilen. Ebenso so variable wie das Befallsmuster der Erkrankung ist, ist auch die Verlaufsform und Therapie.

In den letzten Jahren konnten verschiedenen Mutationen (*BRAF*, *MAP2K1*) innerhalb des RAS-RAF-MEK-ERK- Signalweg nachgewiesen werden. Woraus sich viele neue Behandlungsansätze ergaben.

In dieser Studie wurde die bisher größte Kohorte (n=145) an kindlichen Langerzell-Histiozytosen immunhistochemisch und molekular auf ihre Charakterisierungen untersucht. Zunächst erfolgte die Untersuchung immunhistochemische Marker (ALKD5F3, IL-17A, SH-PTP-1, PD-L1 (zwei Klone)) auf ihr Vorkommen und ihre mögliche Korrelation mit der klinischen Ausprägung bei monosystemischen und multisystemischen Langerhanszell-Histiozytosen.

Der Marker ALKD5F3 wurde in keiner hier untersuchten Langerhanszell-Histiozytose nachgewiesen und scheint deshalb keine Rolle in der Pathogenese der kindlichen LCH zu spielen. SH-PTP-1 hingegen wurde von allen hier untersuchten Tumoren exprimiert. Aufgrund der fehlenden Differenzierung der Färbung, scheint SH-PTP1 als immunhistochemischer Marker für die Diagnostik und Prognose der kindlichen Langerhanszell-Histiozytose zu diesem Zeitpunkt keine größere Rolle zu spielen. In einem Teil der kindlichen LCH wurde jedoch eine IL-17A- und PD-L1- Expression nachgewiesen. Vor allem für die beiden verwendeten Klone des Markers PD-L1 zeigten sich signifikante Unterschiede im Expressionsprofil bei den gleichen Tumoren. Es bleibt also zu klären welche genaue Rolle die Expression von IL-17A und PD-L1 in der Ätiologie der LCH spielt. Einen Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen Expression und der klinischen Präsentation der Erkrankung konnten für keinen Marker nachgewiesen werden.

Außerdem wurden in dieser Arbeit die zwei häufigen nachgewiesenen Mutationen *BRAFV600E* und *MAP2K1* im RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg bei Langerhanszell-Histiozytosen untersucht. Der *BRAF*-Nachweis erfolgte mittels des immunhistochemischen Surrogatmarker BRAFV600E, während die *MAP2K1*-Mutationsdiagnostik mittels Sanger-Sequenzierung

erfolgte. In der ICH zeigte sich bei 28,9 % der kindlichen Fälle eine Expression von BRAFV600E. Dieser Wert liegt deutlich unter den in der Literatur beschriebenen Inzidenzraten. Zwar scheint die *BRAF*-Mutation eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der vorliegenden kindlichen LCH-Fälle zu spielen, die Immunhistochemie als Surrogatmarker für eine Mutation ist jedoch zu hinterfragen.

Bei der Sanger-Sequenzierung des *MAP2K1*-Gens der Langerhanszell-Histiozytosen, konnten sowohl bereits in der Literatur beschriebene Mutationen, als auch drei bis dato noch nicht beschriebene Mutationen nachgewiesen werden. Die Inzidenz von *MAP2K1*-Mutationen unter den *BRAF*-Wildtypen blieb mit 23% in dem untersuchten rein kindlichen Kollektiv unter den Literaturdaten. Weder für die BRAFV600E- noch für die *MAP2K1*-Mutationen ließen sich Zusammenhänge zwischen der Expression und der Krankheitsausprägung nachweisen.

Die hier präsentierten Ergebnisse lassen auf die Präsenz von *BRAFV600E*-oder *MAP2K1*-Mutationen bei über 50 % der kindlichen LCH schließen. In kindlichen LCH korreliert weder die Expression von IL17A, PD-L1 und SH-PTP1 noch der Mutationsstatus für *BRAFV600E* und *MAP2K1* mit der klinischen Krankheitsausprägung. Die nachgewiesene Expression von IL-17A und PD-L1 in einem Teil der Fälle könnte jedoch neue Therapieoptionen für Kinder mit LCH eröffnen.

6 Literaturverzeichnis

- Abła, O., Egeler, R.M., Weitzman, S. (2010): Langerhans cell histiocytosis: Current concepts and treatments. *Cancer Treat Rev.* 36, 354–359.
- Abła, O., Weitzman, S. (2015): Treatment of Langerhans cell histiocytosis: role of BRAF/MAPK inhibition. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015, 565-570.
- Ahn, N.G. (1993): The MAP kinase cascade. Discovery of a new signal transduction pathway. *Mol Cell Biochem* 127–128, 201–209.
- Alayed, K., Medeiros, L.J., Patel, K.P., Zuo, Z., Li, S., Verma, S., Galbincea, J., Cason, J.R., Luthra, R., Yin, C.C. (2016): BRAF and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis: a study of 50 cases. *Human Pathology* 52, 61 –67.
- Ali, G., Proietti, A., Pelliccioni, S., Niccoli, C., Lupi, C., Sensi, E., Giannini, R., Borrelli, N., Menghi, M., Chella, A., Ribechini, A., Cappuzzo, F., Melfi, F., Lucchi, M., Mussi, A., Fontanini, G. (2014): ALK rearrangement in a large series of consecutive non-small cell lung cancers: comparison between a new immunohistochemical approach and uorescence in situ hybridization for the screening of patients eligible for crizotinib treatment. *Arch Pathol Lab Med.* 138, 1449-1458.
- Allen, C. E., & McClain, K. L. (2009): IL-17A is not expressed by CD207+ cells in Langerhans Cell Histiocytosis lesions. *Nature Medicine* 15(5), 483.
- Allen, C.E., Li, L., Peters, T.L., Leung, H.C., Yu, A., Man, T.K., Gurusiddappa, S., Phillips, M.T., Hicks, M.J., Gaikwad, A., Merad, M., McClain, K.L. (2010): Cell-specific gene expression in Langerhans cell histiocytosis lesions reveals a distinct profile compared with epidermal Langerhans cells. *J Immunol.* 184(8), 4557-4567.
- Alston, R.D., Tatevossian, R.G., McNally, R.J., Kelsey, A., Birch, J.M., Eden, T.O. (2007): Incidence and survival of childhood Langerhans cell histiocytosis in Northwest England from 1954 to 1998. *Pediatr Blood Cancer* 48, 555–560.
- Altman D G. *Practical Statistics for Medical Research* (1991), Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, USA.
- Aricò, M. (2016): Langerhans cell histiocytosis in children: from the bench to bedside for an updated therapy, *British Journal of Haematology* 173, 663-670.
- Badalian-Very, G., Vergilio, J.-A., Degar, B. A., MacConaill, L. E., Brandner, B., Calicchio M. L., Kuo, F. C., Ligon, A. H., Stevenson, K. E., Kehoe, S.M., Garraway, L. A., Hahn, W. C., Meyerson, M., Fleming, M.D., Rollins, B. J. (2010): Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 116(11), 1919–1923.
- Bechan, G.I., Egeler, R.M., Arceci, R.J. (2006): Biology of Langerhans cells and

Langerhans cell histiocytosis. *Int Rev Cytol.* 254, 1–43.

- Bernard, F., Thomas, C., Bertrand, Y., Munzer, M., Landman Parker, J., Ouache, M., Colin, V.M., Perel, Y., Chastagner, P., Vermylen, C., Donadieu, J. (2005): Multi-centre pilot study of 2-chlorodeoxyadenosine and cytosine arabinoside combined chemotherapy in refractory Langerhans cell histiocytosis with haematological dysfunction. *Eur J Cancer* 41(17), 2682–2689.
- Berres, M.L., Lim, K.P., Peters, T., Price, J., Takizawa, H., Salmon, H., Idoyaga, J., Ruzo, A., Lupo, P.J., Hicks, M.J., Shih, A., Simko, S.J., Abhyankar, H., Chakraborty, R., Leboeuf, M., Beltrao, M., Lira, S.A., Heym, K.M., Bigley, V., Collin, M., Manz, M.G., McClain, K., Merad, M., Allen, C.E. (2014): BRAFV600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med.* 211, 699-683.
- Berres, M.-L., Merad, M., & Allen, C. E. (2015): Progress in understanding the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis: back to Histiocytosis X? *British Journal of Haematology* 169(1), 3–13.
- Bonner, T., O'Brien, S.J., Nash, W.G., Rapp, U.R., Morton, C.C., Leder, P. (1984): The human homologs of the raf (mil) oncogene are located on human chromosomes 3 and 4. *Science* 223, 71–74.
- Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Gregory, J.S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., Cobb, M.H. (1990): An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249, 64–67.
- Braier, J., Ciocca, M., Latella, A., de Davila, M.G., Drajer, M., Imventarza, O. (2002): Cholestasis, sclerosing cholangitis, and liver transplantation in Langerhans cell Histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 38 (3), 178-82.
- Broadbent, V., Pritchard, J., Davies, E.G., Heaf, D., Pincott, J.R., Pritchard, J., Levinsky, R.J., Atherton, D.J., Tucker, S. (1984): Spontaneous remission of multi-system histiocytosis X. *Lancet* 1(8371), 253–254.
- Brown, N.A., Furtado, L.V., Betz, B.L., Kiel, M.J., Weigelin, H.C., Lim, M.S., Elenitoba-Johnson, K.S. (2014): High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 124(10), 1655–1658.
- Caselli, D. et Aricò, M.; EBMT Paediatric Working Party (2008): The role of BMT in childhood histiocytoses. *Bone Marrow Transplantation.*, 41 Suppl. 2, S8-S13.
- Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer:
<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=MAP2K1&ln1=MAP2K1&start=1>

&end=394&coords=AA %3AAA&sn=&ss=&hn=&sh=&wgs=off&mut=deletion_inframe&id=253# (letzter Zugriff: 28.06.2017)

- Chakraborty, R., Hampton, O.A., Shen, X., Simko, S.J., Shih, A., Abhyankar, H., Lim, K.P., Covington, K.R., Trevino, L., Dewal, N., Muzny, D.M., Doddapaneni, H., Hu, J., Wang, L., Lupo, P.J., Hicks, M.J., Bonilla, D.L., Dwyer, K.C., Berres, M.L., Poulikakos, P.I., Merad, M., McClain, K.L., Wheeler, D.A., Allen, C.E., Parsons, D.W. (2014): Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis. *Blood* 124(19), 3007–3015.
- Cobb, M.H., Robbins, D.J., Boulton, T.G. (1991): ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 3, 1025–1032.
- Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1995): How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem.* 270:14843–14846.
- Coury, F., Annels, N., Rivollier, A., Olsson, S., Santoro, A., Speziani, C., Azocar, O., Flacher, M., Djebali, S., Tebib, J., Brytting, M., Egeler, R.M., Roubourdin-Combe, C., Henter, J.-I., Arico, M., Delprat, C. (2008): Langerhans cell histiocytosis reveals a new IL-17A-dependent pathway of dendritic cell fusion. *Nat Med.* 14, 81–87.
- Crews, C., Alessandrini, A., Erikson, R. (1992): The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258, 478–480.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W.C., Leung, S. Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., Futreal, A. (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 417, 949–954.
- Diamond, E.L., Durham, B.H., Haroche, J., Yao, Z., Ma, J., Parikh, S.A., Wang, Z., Choi, J., Kim, E., Cohen-Aubart, F., Lee, S.C., Gao, Y., Micol, J.B., Campbell, P., Walsh, M.P., Sylvester, B., Dolgalev, I., Aminova, O., Heguy, A., Zapille, P., Naitandwe, J., Ganzel, C., Dalton, J.D., Ellison, D.W., Estrada-Veras, J., Lacouture, M., Gahl, W.A., Stephens, P.J., Miller, V.A., Ross, J.S., Ali, S.M., Briggs, S.R., Fasan, O., Block, J., Héritier, S., Donadieu, J., Solit, D.B., Hyman, D.M., Baselga, J., Janku, F., Taylor, B.S., Park, C.Y., Amoura, Z., Dogan, A., Emile, J.F., Rosen, N., Gruber, T.A.,

- Abdel-Wahab, O. (2016): Diverse and targetable kinase alterations drive histiocytic neoplasms. *Cancer Discov.* 6(2), 154–165.
- Dziegiel, P., Dolilnska-Krajewska, B., Dumanska, M., Weclawek, J., Jelen, M., Podhorska-Okolów, M. (2007): Coexpression of CD1a, langerin and Birbeck’s granules in Langerhanscell histiocytoses (LCH) in children: ultrastructural and immunocytochemical studies. *Folia Histochem Cytobiol.* 45, 21–25.
 - Dunger, D.B., Broadbent, V., Yeoman, E., Seckl, J.R., Lightman, S.L., Grant, D.B., Pritchard, J. (1989): The frequency and natural history of Diabetes insipidus in children with Langerhans-cell histiocytosis. *N Engl J Med* 321(17), 1157-1162.
 - Euro-Histio-Net:
http://www.eurohistio.net/e1623/e1554/e1856/e2319/e2268/index_eng.html#literature_1 (letzter Zugriff 10.12.2017)
 - Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R. F., Sosman, J., Weber, J. et al. (2012): Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *The New England Journal of Medicine* 367(18), 1694–1703.
 - Gadner, H., Heitger, A., Grois, N., Gatterer-Menz, I., Ladisch, S. (1994): Treatment strategy for disseminated Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol*; 23:72-80.
 - Gadner, H., Grois, N., Arico, M., Broadbent, V., Ceci, A., Jakobson, A., Komp, D., Michaelis, J., Nicholson, S., Pötschger, U., Pritchard, J., Ladisch, S. (2001): A randomized trial of treatment for multisystem Langerhans’ cell histiocytosis. *Journal of Pediatrics* 138, 728–734.
 - Gadner, H., Grois, N., Pötschger, U., Minkov, M., Aricò, M., Braier, J., Broadbent, V., DONadieu, J., Henter, J-I., McCarter, R., Ladisch, S., Histiocyte Society (2008): Improved outcome in multisystem Langerhans cell histiocytosis is associated with therapy intensification. *Blood* 111, 2556-2562.
 - Gadner, H., Minkov, M., Grois, N., Pötschger, U., Thiem, E., Aricò, M., Astigarraga, I., Braier, J., Donadieu, J., Henter, J., Janka-Schaub, G., McClain, K. L., Weitzman, S., Windebank, K., & Ladisch, S. (2013). Therapy prolongation improves outcome in multisystem Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 121(25), 5006-5014.
 - Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R. (2015): Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 372(21), 2018–2028.
 - Gatalica, Z., Bilalovic, N., Palazzo, J.P., Bender, R.P., Swensen, J., Millis, S.Z., Vranic, S., Von Hoff, D., Arceci, R.J. (2015): Disseminated histiocytoses biomarkers beyond BRAFV600E: frequent expression of PD-L1. *Oncotarget* 6(23), 19819–19825.

- Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0151_S1_Langerhanszellhistiozytose_im_Kindesalter_2013-01.pdf (letzter Zugriff 10.12.2016)
- Gravelle, P., Burrioni, B., Péricart, S., Rossi, C., Bezombes, C., Tosolini, M., Damotte D., Brousset, P., Fournié, J.-J., Laurent, C. (2017): Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget* 8(27), 44960–44975.
- Greenberger, J.S., Crocker, A.C., Vawter, G., Jaffe, N., Cassady, J.R. (1981): Results of treatment of 127 patients with systemic histiocytosis. *Medicine (Baltimore)* 60, 331–338.
- Guyot-Goubin, A., Donadieu, J., Barkaoui, M., Bellec, S., Thomas, C., Clavel, J. (2008): Descriptive epidemiology of childhood Langerhans cell histiocytosis in France, 2000-2004. *Pediatr Blood Cancer* 51, 71–75.
- Haroche, J., Charlotte, F., Arnaud, L., von Deimling, A., Hélias-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, M.C., Fraïtag, S., Sahm, F., Brousse, N., Amoura, Z., Donadieu, J., Emile, J.F. (2012): High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood* 120, 2700-2703.
- Haroche, J., Cohen-Aubart, F., Emile, J.F., Arnaud, L., Maksud, P., Charlotte, F., Cluzel, P., Drier, A., Hervier, B., Benameur, N., Besnard, S., Donadieu, J., Amoura, Z. (2013): Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation. *Blood* 121(9), 1495-1500.
- Haroche, J., Cohen-Aubart, F., Emile, J.F., Maksud, P., Drier, A., Tolédano, D., Barete, S., Charlotte, F., Cluzel, P., Donadieu, J., Benameur, N., Grenier, P.A., Besnard, S., Ory, J.P., Lifemann, F., Idhah, A., Granel, B., Graffin, B., Hervier, B., Arnaud, L., Amoura, Z. (2015): Reproducible and sustained efficacy of targeted therapy with vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-mutated Erdheim-Chester disease. *J Clin Oncol.* 33(5), 411–418.
- Haupt, R., Nanduri, V., Calevo, M.G., Bernstrand, C., Braier, J.L., Broadbent, V., Broadbent, V., Rey, G., McClain, K.L., Janka-Schaub, G., Egeler, R.M. (2004): Permanent consequences in Langerhans cell histiocytosis patients: a pilot study from

- the Histiocyte Society-Late Effects Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 42(5):438– 444.
- Héritier, S., Jehanne, M., Leverger, G., Emile, J.F., Alvarez, J.C., Haroche, J., Donadieu, J., (2015): Vemurafenib use in an infant for high-risk langerhans cell histiocytosis. *JAMA Oncology* 1, 836-868.
 - Hoeger, P.H., Nanduri, V.R., Harper, J.I., Atherton, D.A., Pritchard, J. (2000): Long term follow up of topical mustine treatment for cutaneous langerhans cell histiocytosis. *Archives of Disease in Childhood* 82, 483-487.
 - Huebner, K., ar-Rushdi, A., Griffin, C.A., Isobe, M., Kozak, C., Emanuel, B.S., Nagarajan, L., Cleveland, J.L., Bonner, T.I., Goldsborough, M.D. (1986): Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 3934–3938.
 - Huleihel, M., Goldsborough, M., Cleveland, J., Gunnell, M., Bonner, T., Rapp, U.R. (1986): Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2655–2662.
 - Hutter, C., Kauer, M., Simonitsch-Klupp, I., Jug, G., Schwentner, R., Leitner, J., Bock, P., Steinberger, P, Bauer, W., Carlesso, N., Minkov, M., Gadner, H., Stingl, G., Kovar, H., Kriehuber, E. (2012): Notch is active in Langerhans cell histiocytosis and confers pathognomonic features on dendritic cells. *Blood* 120(26), 5199–5208.
 - Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T., Toyoshima, K. (1988): B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2651–2654.
 - Ishikawa, F., Takaku, F., Nagao, M., Sugimura, T. (1987): The complete primary structure of the rat A-raf cDNA coding region: conservation of the putative regulatory regions present in rat c-raf. *Oncogene Res.* 1, 243–253.
 - Ishikawa, F., Takaku, F., Ochiai, M., Hayashi, K., Hirohashi, S., Terada, M., Takayama, S., Nagao, M., Sugimura, T. (1985): Activated c-raf gene in a rat hepatocellular carcinoma induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 186–192.
 - Jelinek, T., Dent, P., Sturgill, T.W., Weber, M.J. (1996): Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 16, 1027–1034.
 - Julien, S.G., Dubé, N., Hardy, S., Tremblay, M.L. (2011): Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat Rev Cancer* 11, 35–49.
 - Keir, M.E., Francisco, L.M., Sharpe, A.H. (2007): PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol.* 19, 309-314.

- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H. (2008): PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.
- Komp, D.M., Herson, J., Starling, K.A., Vietti, T.J., Hvizdala, E. (1981): A staging system for Histiocytosis X: A southwest oncology group study. *Cancer*; 47:798–800.
- Kozak, C., Gunnell, M. A., Rapp, U. R. (1984): A new oncogene, c-raf, is located on mouse chromosome 6. *J. Virol.* 49, 297–299.
- Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida, Y., Suzuki, N., Hasegawa, D., Nagatoshi, Y., Kato, S., Ishii, E. (2010): Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant* 45(5), 901-906.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, F.X., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., Avruch, J. (1992): Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417–421.
- Lahey, M.E. (1975): Histiocytosis X—an analysis of prognostic factors. *J Pediatr* 87, 184-189.
- Lu, Z., Hunter, T. (2009): Degradation of activated protein kinases by ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 78, 435–475.
- Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G.F., Ahn, N.G. (1994): Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265, 966–970.
- Mark, G. E., Seeley, T. W., Shows, T. B., Mountz, J. D. (1986): pks, a raf-related sequence in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 6312–6316.
- Mc Dermott, R., Ziylan, U., Spohner, D., Bausinger, H., Lipsker, D., Mommaas, M., Cazenave, J.-P., Raposo, G., Goud, B., de la Salle, H., Salamero, Hunau, D. (2002): Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells which form where langerin accumulates. *Mol Biol Cell*, 13, 317-335.
- McLelland, J., Broadbent, V., Yeomans, E., Malone, M., Pritchard, J. (1990): Langerhans cell histiocytosis: the case for conservative treatment. *Archives of Disease in Childhood* 65, 301-303.
- Méhes, G., Irsai, G., Bedekovics, J., Beke, L., Fazakas, F., Rózsa, T., Kiss, C. (2014): Activating BRAF V600E Mutation in Aggressive Pediatric Langerhans Cell Histiocytosis: demonstration by Allele-specific PCR/ Direct Sequencing and Immunohistochemistry. *Am J Surg Path* 38(12), 1644–1648.
- Minkov, M. (2011): Multisystem Langerhans cell histiocytosis in children: current

treatment and future directions. *Paediatr Drugs*.13(2), 75–86.

- Minkov, M., Grois, N., Heitger, A., Pötschger, U., Westermeier, T., Gadner, H. (2002): Response to initial treatment of multisystem Langerhans cell histiocytosis: an important prognostic indicator. *Med Pediatr Oncol*. 39, 581–585.
- Minkov, M., Prosch, H., Steiner, M., Grois, N., Pötschger, U., Kaatsch, P., Janka-Schaub, G., Gadner, H. (2005): Langerhans cell histiocytosis in neonates. *Pediatr Blood Cancer* 45(6), 802-807.
- Minkov, M., Hutter, C. (2016): Insights into the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis: the development of targeted therapies. *Immunotargets Ther*. 5, 81-91.
- Mok, S.C., Kwok, T.T., Berkowitz, R.S., Barrett, A.J., Tsui, F.W. (1995): Overexpression of the protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 (PTPN6), in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 57, 299–303.
- Morimoto, A., Ikushima, S., Kinugawa, N., Ishii, E., Kohdera, U., Sako, M., Fujimoto, J., Bessho, F., Horibe, K., Tsunematsu, Y., Imashuku, S. (2006): Improved outcome in the treatment of pediatric multifocal Langerhans cell histiocytosis. Results from the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 Protocol., *Cancer* 107, 613–619.
- Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L. and Look, A. T. (1994): Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263, 1281–1284.
- Murakami, I., Oka, T., Kuwamoto, S., Kato, M., Hayashi, K., Gogusev, J., Imamura, T., Morimoto, A., Imashuku, S., Yoshino, T. (2011): Tyrosine phosphatase SHP-1 is expressed higher in multisystem than in single-system Langerhans cell histiocytosis by immunohistochemistry. *Virchows Arch* 459, 227–34.
- Murakami, I., Morimoto, A., Oka, T., Kuwamoto, S., Kato, M., Horie, Y., Hayashi, K., Gogusev, J., Jaubert, F., Imashuku, S., Al-Kadar, L.A., Takata, K., Yoshino, T.(2013): IL-17A receptor expression differs between subclasses of Langerhans cell histiocytosis, which might settle the IL-17A controversy. *Virchows Arch*. 462, 219–228.
- Murakami, I., Matsushita, M., Iwasaki, T., Kuwamoto, S., Kato, M, Nagata, K., Horie, Y., Hayashi, K., Imamura, T, Morimoto, A., Imashuku, S., Gogusev, J., Jaubert, F., Takata, K., Oka, T., Yoshino, T. (2015): Interleukin-1 loop model for pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. *Cell Communication and Signaling* 13(1), 13. (a)
- Murakami, I., Oh, Y., Morimoto, A., Sano, H., Kanzaki, S., Matsushita, M., Iwasaki, T., Kuwamoto, S., Kato, M., Nagata, K., Hayashi, K., Imashuku, S., Gogusev, J., Jaubert, F., Oka, T., Yoshino, T. (2015): Acute-phase ITIH4 levels distinguish multi-system from

single-system Langerhans cell histiocytosis via plasma peptidomics. *Clinical Proteomics* 12(1), 16. (b)

- Nanduri, V.R., Pritchard, J., Levitt, G., Glaser, A.W. (2006): Long term morbidity and health related quality of life after multi-system Langerhans cell histiocytosis. *European journal of cancer* 42, 2563.
- Nelson, D.S., van Halteren, A., Quispel, W.T., van den Bos, C., Bovée, J.V., Patel, B., Badalian-Very, G., van Hummelen, P., Ducar, M., Lin, L., MacConaill, L.E., Egeler, R.M., Rollins, B.J. (2015): MAP2K1 and MAP3K1 mutations in Langerhans cell Histiocytosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 54, 361-368.
- Nichirei Bioscience:
<https://www.nichirei.co.jp/bio/english/pdf/catalog2014-2015s.pdf>
- Oka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., Nakanishi, T., Yamaai, Y., Hiraki, A., Sogawa, C.A., Kondo, E., Teramoto, N., Takahashi, K., Tsuchiyama, J., Akagi, T. (2001): Reduction of hematopoietic cell specific tyrosine phosphatase SHP-1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemias: combination analysis with cDNA expression array and tissue microarray. *Am J Pathol* 159, 1495–1505.
- Pardoll, D.M. (2012): The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 12, 252–264.
- Pawson, T., Scott, J.D. (1997): Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science* 278, 2075–2080.
- Perkins, S.L., Pickering, D., Lowe, E.J., Zwick, D., Abromowitch, M., Davenport, G., Cairo, M.S., Sanger, W.G. (2005): Childhood anaplastic large cell lymphoma has a high incidence of ALK gene rearrangement as determined by immunohistochemical staining and fluorescent in situ hybridisation: a genetic and pathological correlation. *Br J Haematol* 131, 624–627.
- Peters, T.L., McClain, K.L., Allen, C.E. (2011) Neither IL-17A mRNA nor IL-17A protein are detectable in Langerhans cell histiocytosis lesions. *MolTher* 19, 1433–1439.
- Peyssonnaud, C., Eyche`ne, A. (2001): The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell* 93, 53–62.
- Ramachandran, I.R., Song, W., Lapteva, N., Seethammagari, M., Slawin, K.M., Spencer, D.M., Levitt, J.M. (2011): The phosphatase SRC homology region 2 domain- containing phosphatase-1 is an intrinsic central regulator of dendritic cell function. *J Immunol*. 186, 3934–45.

- Rimm, D.L., Han, G., Taube, J.M., Yi, E.S., Bridge, J.A., Flieder, D.B., Homer, R., West, W.W., Wu, H., Roden, A.C., Fujimoto, J., Yu, H., Anders, R., Kowalewski, A., Rivard, C., Rehman, J., Batenchuk, C., Burns, V., Hirsch, F.R., Wistuba, I.I. (2017): A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 3, 1051-1058.
- Roden, A.C., Hu, X., Kip, S., Parrilla Castellar, E.R., Rumilla, K.M., Vrana, J.A., Vassallo, R., Ryu, J.H., Yi, E.S. (2014): BRAFV600E expression in Langerhans cell histiocytosis: clinical and immunohistochemical study on 25 pulmonary and 54 extrapulmonary cases. *Am J Surg Pathol* 38, 548-551.
- Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattei, M.G., Denizot, F., Golstein, P. (1993): CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 150, 5445–5456.
- Sahm, F., Capper, D., Preusser, M., Meyer, J., Stenzinger, A., Lasitschka, F., Berghoff, A.S., Habel, A., Schneider, M., Kulozik, A., Anagnostopoulos, I., Müllauer, L., Mechttersheimer, G., von Deimling, A. (2012): BRAFV600E mutant protein is expressed in cells of variable maturation in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 120, 28-34.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74(12), 5463–5467.
- Satoh, T., Smith, A., Sarde, A., Lu, H., Mian, S., Trouillet, C., Mufti, G., Emile, J.F., Fraternali, F., Donadieu, J., Geissmann, F. (2012): B-RAF mutant alleles associated with Langerhans cell histiocytosis, a granulomatous pediatric disease. *PLoS One* 7(4), e33891.
- Scheel, A.H., Dietel, M., Heukamp, L.C., Jöhrens, K., Kirchner, T., Reu, S., Rüschoff, J., Schildhaus, H.U., Schirmacher, P., Tiemann, M., Warth, A., Weichert, W., Fischer, R.N., Wolf, J., Büttner, R. (2016): Prädiktive PD-L1-Immunhistochemie beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. *Pathologe* 2016(37), 557–567.
- Sheehan, M.P., Atherton, D.J., Broadbent, V., Pritchard, J. (1991): Topical nitrogen mustard: an effective treatment for cutaneous Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr* 119(2), 317–321.
- Simon, M.A., Bowtell, D.D., Dodson, G.S., Laverty, T.R., Rubin, G.M. (1991): Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67, 701–716.

- Sithanandam, G., Kolch, W., Duh, F.M., Rapp, U.R. (1990): Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies. *Oncogene* 5(12), 1775–80.
- Smith, J., Robida, M.D., Acosta, K., Vennapusa, B., Mistry, A., Martin, G., Yates, A., Hnatyszyn, H.J. (2016): Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagn Pathol.* 11, 44.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561–566.
- Stoica, G.E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D.J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A.T., Wellstein, A. (2001): Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *The Journal of biological chemistry.* 276, 16772–16779.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (2008) Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization classification of tumours, Chapter 14, 353–367. International Agency for Research on Cancer, Lyon
- Taube, J.M., Klein, A.P., Brahmer, J.R., Xu, H., Pan, X., Kim, J.H., Chen, L., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., Anders, R.A. (2014): Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 1, 5064–5075.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M., Sznol, M. (2012): Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 366, 2443-2454.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecque, S., Saeland, S. (2000): Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71–81.
- Veys, P.A., Nanduri, V., Baker, K.S., He, W., Bandini, G., Biondi, A., Dalissier, A., Davis, J.H., Eames, G.M., Egeler, R.M., Filipovich, A.H., Fischer, A., Jürgens,

H., Krance, R., Lanino, E., Leung, W.H., Matthes, S., Michel, G., Orchard, P.J., Pieczonka, A., Ringdén, O., Schlegel, P.G., Sirvent, A., Vettenranta, K., Eapen, M. (2015): Haematopoietic stem cell transplantation for refractory Langerhans cell histiocytosis: outcome by intensity of conditioning. *British J Haematol.* 169(5), 711-718.

- Vokuhl, C., Oshlies, I., Klapper, W., Leuschner, I. (2015): Histiocytaire Erkrankung des Kindes- und Jugendalters. *Pathologe* 36, 443–450.
- Willman, C., Busque, L., Griffith, B.B., Favara, B.E., McClain, K.L., Duncan, M.H., Gilliland, D.G. (1994): Langerhans' cell histiocytosis (histiocytosis X), a clonal proliferative disease. *N Engl J Med.* 331, 154–160.
- Xu, J., Sun, H.H., Fletcher, C.D., Hornick, J.L., Morgan, E.A., Freeman, G.J., Hodi, F.S., Pinkus, G.S., Rodig, S.J. (2016): Expression of Programmed Cell Death 1 Ligands (PD-L1 and PD-L2) in Histiocytic and Dendritic Cell Disorders. *Am J Surg Pathol.* 4, 443-53.
- Yoon, S., Seger, R. (2006): The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21–44.
- Yu, R.C., Chu, C., Buluweda, L., Chu, A.C. (1994): Clonal proliferation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Lancet* 343, 767–768.
- Zeng, K., Wang, Z., Ohshima, K., Liu, Y., Zhang, W., Wang, L., Fan, L., Li, M., Li, X., Wang, Y., Yu, Z., Yan, Q., Guo, S., Wei, J., Guo, Y. (2016): BRAF V600E mutation correlates with suppressive tumor immune microenvironment and reduced disease-free survival in Langerhans cell histiocytosis. *Oncoimmunology* 5(7), e1185582.
- Zhang, Q., Raghunath, P.N., Vonderheid, E., Odum, N., Wasik, M.A. (2000): Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter. *Am J Pathol* 157, 1137–1146.

7 Danksagung

Das Thema dieser Arbeit wurde mir von Herrn Prof. Dr. med. Ivo Leuschner aus der Sektion für Kinderpathologie überlassen. Er war mit seiner geduldigen Art stets bemüht meine Fragen und Sorgen zu beantworten. Sein plötzliches und frühes Versterben während der Verfassung dieser Arbeit hat mich sehr betroffen gemacht. Ich werde ihn stets in guter Erinnerung behalten.

Ich bedanke mich auch bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes, die mich zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt haben. Herrn Dr. med. Christian Vokuhl danke ich für die fachliche Mikroskopierhilfe. Ilka, Alicja und Silvia danke ich für eure immerwährende Motivation und Hilfestellung in der Laborarbeit. Ein besonderer Dank geht an Ilka, die mich mit ihrer unglaublichen Begeisterung für die Laborarbeit immer wieder motiviert hat. Ohne die Unterstützung aller Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Einen ganz besonderen Dank möchte ich Frau PD Dr. med. Oschlies aussprechen. Nach dem plötzlichen Tod von Herrn Leuschner wurde ich von Ihr weiter betreut. Frau Oschlies stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Danke! Einen besonderen Dank möchte ich auch Herrn Dr. rer. medic. Hans-Michael Behrens aussprechen. Er konnte mich mit seinem unglaublichen Wissen durch den Dschungel der Statistik führen.

Danke auch an meine Freunde, die mich stets motiviert haben weiterzumachen. Ohne euch wären die stressigen Phasen des Studiums und dieser Arbeit nicht zu schaffen gewesen. Danke für euer Korrekturlesen. Ihr seid die Besten!

Vor allem aber möchte ich meiner Familie danken. Ihr habt mir das Medizinstudium erst möglich gemacht und mich in allen Höhen und Tiefen unterstützt. Danke, dass ihr immer an mich glaubt. Danke Lennart, dass du mein Leben jeden Tag bereicherst und mir immer wieder neue Kraft gegeben hast die Arbeit zu Ende zu bringen.

8 Projektbezogene Publikationen

Abstract und Vortrag

Autoren:

Monsees, S., Vokuhl, C., Oschlies, I., Leuschner, I. († 29.01.2017)

Publikation:

Immunhistochemische und molekulare Charakterisierung von Langerhanszell-Histiozytosen im Kindesalter, 102. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. (DGP), 24-26. Mai, Berlin, Deutschland.

9 Anhang

Ethikvotum

In der vorliegenden Arbeit wurde mit vollständig anonymisierten Daten und Materialien ohne Rückschlussmöglichkeit auf personenbezogene Daten gearbeitet, sodass nach § 15 der ärztlichen Berufsordnung für die vorliegende Arbeit kein explizites Ethikvotum erforderlich ist. Die Arbeit wurde initial von Herrn Professor Leuschner, Paidopathologie betreut und nach dessen Versterben im Februar 2017 von Frau PD Dr. Oschlies weiterbetreut. Aufgrund der oben genannten Situation ist anzunehmen, dass Herr Prof. Leuschner die zusätzliche Einholung eines Ethikvotums für die Arbeit nicht erforderlich hielt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den.....

.....

(Svea Monsees)