

Nachweis der BRAF Mutation V595E in Urin, Ausstrichen und Paraffinmaterial – ein neues diagnostisches Tool beim kaninen Übergangszellkarzinom

H. Aupperle-Lellbach¹, P. Pantke², C. Hohloch¹, M. Weiss¹, A. Heusinger¹, A. Kehl¹

¹Laboklin GmbH & Co KG, Bad Kissingen
²AniCura Bielefeld, Tierärztliche Klinik für Kleintiere

Einleitung

Mutation (syn. Variante) des BRAF Gens

- Häufige Ursache für eine Tumorentstehung beim Menschen → Proliferation und Entdifferenzierung

- Studie aus den USA (Mochizuki et al. 2015a+b): Tumorzellen von ca. 85% der untersuchten **kaninen Übergangszellkarzinome** weisen die BRAF Mutation V595E (syn. V450E) auf. (PLoS ONE 2015a, 10(6):e0129534; PLoS ONE 2015b, 10(12):e0144170)



Fragestellungen

- **Häufigkeit** der BRAF Mutation V595E im eigenen Tiergut?
- Etablierung der **Methodik** für Biopsien, Ausstriche, Urin → Verbesserung der nicht-invasiven Diagnostik des ÜZCa beim Hund

Tiergut und Methoden

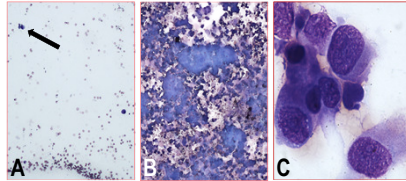
- **66 Hunde:** 0,5-17 Jahre alt (Median 10 Jahre)
15x w, 21x wk, 18x m, 12x mk
- **Material:** 45 Biopsien
48 Urinproben
31 zytologische Ausstriche
- **Diagnosen:** 33x Übergangszellkarzinom
23x Zystitis
7x Harnblasenpolyp
3x o.b.B.
- **Routinezytologie und -histologie:**
u.a. Zellgehalt der Ausstriche, Graduierung der ÜZCa
- **Molekulargenetik:**
DNA-Isolation mittels kommerzieller Testkits
Sanger Sequenzierung auf die BRAF Variante c.1784T>A



Ergebnisse

Erfolgreiche DNA-Isolation aus:

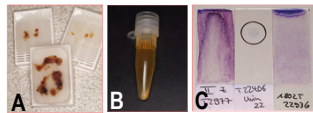
- 39/45 Paraffinproben
- 38/48 Urinproben
- 16/18 „zellreichen“ Ausstrichen
- 3/13 „zellarmen“ Ausstrichen



- Abb. 1:
- A: „Zellarmes“ Zytozentrifugationspräparat mit vereinzelt Epithelzellen (Pfeil) → zu wenig Zellen für eine BRAF-Mutationsanalyse
 - B: „Zellreicher“, dicker Ausstrich, Epithelzellen morphologisch nicht beurteilbar → eine typische Indikation für die BRAF-Mutationsanalyse
 - C: „Zellreicher“, gut auswertbarer Ausstrich mit Malignitätskriterien der Übergangsepithelzellen

Verschiedene Materialien von einem Tier

- Biopsie/Paraffinmaterial (A)
- Urin(sediment) (B)
- Zytologie (C)

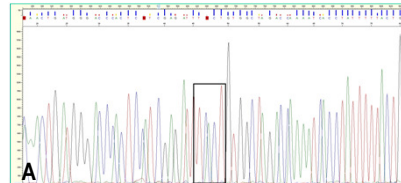


→ Übereinstimmende Ergebnisse der BRAF-Analyse, sofern DNA isoliert wurde.

Tab 1: Häufigkeit des Nachweises der Mutation (BRAF Variante c.1784T>A) in Proben aus der Harnblase von 66 Hunden (2/66 keine DNA zu isolieren)

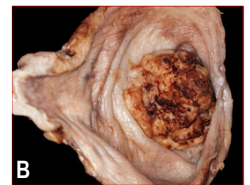
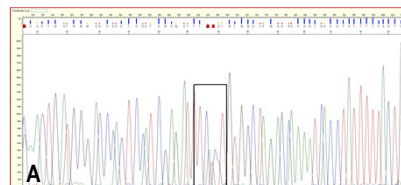
	ÜZCa (n=31)	Polyp (n=7)	Zystitis (n=23)	o.b.B. (n=3)
Homozygoter Normalbefund TT	9	7	23	3
Heterozygote Variante TA (Mutation)	22	0	0	0

Zystitis, Polypen oder o.b.B. → keine BRAF-Mutation (100%)



- Abb. 2:
- A: **Normalbefund** bei der Sanger Sequenzierung des BRAF Gens: Elektropherogramm eines Hundes: Alle Tiere ohne ÜZCa waren homozygot TT (Rahmen) → keine Mutation des BRAF-Gens
 - B: **Harnblasenpolypen** eines 12 Jahre alten Hundes

Übergangszellkarzinom: 22/31 Hunden mit zwei verschiedenen Basen (TA) → BRAF-Mutation festgestellt



- Abb. 3:
- A: Sanger Sequenzierung des Exon 15 des BRAF Gens: Elektropherogramm eines **ÜZCa mit der Variante c.1784T>A**: Ca. 70% der untersuchten ÜZCa waren heterozygot TA (Rahmen) → Mutation des BRAF-Gens
 - B: **Übergangszellkarzinom** der Harnblase eines 12 Jahre alten Hundes

Diskussion

- Die BRAF-Mutationsanalyse wurde an allen routinemäßig eingesandten **Materialien** (Biopsien, Ausstrichen, Urin) etabliert.
- **Voraussetzung:** ausreichende Anzahl von Übergangsepithelzellen in der eingesandten Probe
- **Indikationen** für die BRAF-Mutationsanalyse: 1) nicht invasive Diagnostik
2) zytologisch oder histologisch schlechte Probenqualität und / oder grenzwertig dysplastisches Bild
Die **Sensitivität von ca. 70%** liegt innerhalb der in der Literatur beschriebenen Spannweite (67%-87%).
- Die **Spezifität liegt bei 100%**, da in allen Proben von Hunden ohne ÜZCa keine Mutation nachgewiesen wurde. Das positive Ergebnis ist somit beweisend für ein ÜZCa (oder ggf. auch für ein Prostatakarzinom, bei dem die Mutation ebenfalls auftreten kann).
- **Keine Mutation** nachgewiesen bedeutet: 1) es liegt kein Übergangszellkarzinom vor (z.B. Polyp)
2) es waren keine mutierten Zellen in der Probe (Repräsentativität/Größe der Probe)
3) das ÜZCa ist nicht durch eine BRAF-Genmutation verursacht
→ ein negatives Ergebnis schließt ein ÜZCa nicht aus!
- **Ausblick:** 1) Eignung der Tests zur Früherkennung eines ÜZCa über Urinproben
2) Prognostische und therapeutische Relevanz der BRAF-Mutation (z.B. MAPKinase Inhibitoren)