

**Polyclonal Rabbit  
Anti-Human  
CD117, c-kit**

---

**English  
Code A4502**

**Intended use**

For In Vitro Diagnostic Use.

Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels the transmembrane tyrosine kinase receptor CD117/c-kit, located in hematopoietic stem cells, melanocytes, mast cells, Cajal cells, germ cells, basal cells of skin, and mammary ductal epithelia.<sup>1-5</sup> The antibody may be a useful tool for the identification of several cancers expressing c-kit, including mast cell diseases, acute myeloid leukaemia (AML), small cell lung carcinoma (SCLC), and Ewing sarcoma, and it may aid in the differentiation between gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and other intraabdominal mesenchymal tumors.<sup>1-4</sup> Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

**Synonyms**

KIT; stem cell factor receptor; mast cell growth factor receptor; steel factor receptor; p145(c-kit)

**Summary and explanation**

The protooncogene *c-kit*, localized to human chromosome 4,<sup>6</sup> encodes a transmembrane receptor, CD117/c-kit, belonging to the class III receptor tyrosine kinase family, which includes the receptor for colony-stimulating factor 1, and the platelet-derived growth factor receptors type A and B. The extracellular region of these receptors consists of five immunoglobulin-like domains where the second and third loops are thought to be involved in ligand binding. The intracytoplasmic tyrosine kinase domain is split by a long hydrophilic insert between the ATP-binding region and the phosphotransferase active site. Receptor activation is accompanied by receptor dimerization, substrate phosphorylation and autophosphorylation, receptor internalization, activation of protein kinases and phospholipases, and transcription of different protooncogenes.<sup>5</sup> Generally, the c-kit tyrosine kinase receptor pathway has been shown to be important for tumour growth and progression in several cancers<sup>4</sup> and mutations in the *c-kit* gene leading to ligand-independent phosphorylation (activation) of the c-kit tyrosine kinase, and are believed to have a central pathogenetic role in e.g. gastrointestinal stromal tumours.<sup>7</sup>

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

**Reagent provided**

Affinity-isolated rabbit antibody purified through antigen-bound, activated thiol AvidGel F affinity chromatography and provided in liquid form, in 0.05 mol/L Tris/HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.015 mol/L NaN<sub>3</sub>, pH 7.2, 1% bovine serum albumin. Package size is 1 mL.

Protein concentration g/L: See label on vial.

**Immunogen**

Peptide corresponding to amino acids 963 to 976 at the cytoplasmic C-terminal part of c-kit<sup>1,5</sup>

**Specificity**

In Western blotting of an extract of the small cell lung carcinoma cell line SY, that over-expresses c-kit mRNA, the antibody labels a band of 145 kD corresponding to the c-kit protein. The labelled band is rather broad, from 120 to 155 kD. An additional band of 100 kD is also labelled.<sup>1</sup> In another study applying a different antibody to c-kit, a 100 kD protein was, likewise, labelled. This labelling was abolished when the antibody was incubated with the synthetic c-kit peptide antigen used for immunization.<sup>6</sup>

In Western blotting, the antibody did not react with an extract of the adenocarcinoma cell line HS, that is without *c-kit* gene expression.<sup>1</sup>

**Materials required, but not supplied**

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions.

**Precautions**

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.<sup>9,10</sup>
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

## Storage

Store at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

## Specimen preparation

### *Paraffin Sections*

The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is recommended. For heat-induced epitope retrieval, the following solutions were found efficient: Target Retrieval Solution (code S1700) and Target Retrieval Solution, pH 9 (code S2368). The following solution was found inefficient: Target Retrieval Solution, High pH (code S3308). The staining intensity was found to be reduced by a pretreatment using 0.01 mol/L citrate buffer, pH 6.0. Pre-treatment of tissues with Proteinase K destroyed the epitope. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure.

## Staining procedure

### *Dilution*

Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit (code A4502) may be used at a dilution range of 1:400 to 1:600 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of gastrointestinal stromal tumor and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Target Retrieval Solution (code S1700) and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid-Phase Absorbed, code X0936), diluted to a protein concentration identical to the concentration of the primary antibody.

### *Visualization*

LSAB+ HRP Kit (code K0679) and EnVision+ HRP Kits (codes K4008 and K4010) are recommended. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

### *Automation*

The antibody is well-suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the Dako Autostainer.

## Staining interpretation

The cellular staining pattern for anti-CD117, c-kit is membranous and/or cytoplasmic.

## Performance characteristics

### *Normal Tissues*

The antibody labels breast epithelium, skin basal cells (seemingly melanocytes), spermatocytes, oocytes, tissue mast cells,<sup>1</sup> fibroblast-like bone lining cells<sup>8</sup> and intestinal Cajal cells.

### *Abnormal Tissues*

The antibody labelled 50/56 seminomas/dysgerminomas, 45/123 small cell carcinomas of the lung, 3/7 immature teratomas, 2/11 serous papillary ovarian adenocarcinomas, 2/14 malignant melanomas of skin, 2/18 neuroblastomas, 7/86 pulmonary squamous cell carcinomas, 1/18 basal cell carcinomas, 9/227 non-small cell cervical carcinomas, 1/35 pulmonary adenocarcinomas and 1/92 breast carcinomas.<sup>1</sup> The antibody was also tested on 365 soft tissue sarcomas. Tumors showing occasional immunoreactivity, in most cases focal labelling, were 3/5 melanotic schwannomas, 5/20 angiosarcomas, 4/20 metastatic melanomas, 4/20 Ewing sarcomas/malignant primitive peripheral neuroectodermal tumors, 2/10 perineuriomas, 2/20 extraskelatal myxoid chondrosarcomas. Rare tumor cells were labelled by the antibody in 1/10 low-grade fibromyxoid sarcomas and 1/20 desmoid fibromatosis. More than 35 consecutive GISTs were found to overexpress c-kit when examined with the antibody, results that were confirmed by immunoblotting. The labelling was typically diffuse and generally strong in these tumors.<sup>3</sup> The antibody also labelled activated bone marrow stem cells in bone marrow biopsies from cases of infiltrative malignant lymphomas and osteomyelitis. Labelling of activated bone marrow stem cells were more heterogeneous in cases of aplastic anaemia, myelodysplasia and metastasis from prostate or breast cancer.<sup>8</sup>

No labelling was observed in 17 large cell pulmonary carcinomas, 5 adenosquamous pulmonary carcinomas, 1 mucoepidermoid pulmonary carcinoma, 2 small cell type cervical carcinomas, 9 ovarian clear cell carcinomas, 4 ovarian mucinous cystadenocarcinomas, 4 endometrial carcinomas, 17 germ cell tumors excluding seminomas/dysgerminomas and immature teratomas, 355 gastrointestinal tract carcinomas, 59 liver carcinomas, 31 pancreas carcinomas, 7 gall bladder carcinomas, 16 bile duct carcinomas, 29 kidney carcinomas, 49 urinary bladder carcinomas, 159 prostate carcinomas, 14 adrenal carcinomas, 91 thyroid carcinomas, 45 skin carcinomas, 7 ganglioneuromas, 23 pheochromocytomas, 12 paragangliomas, 7 thyroid medullary carcinomas, 1 retinoblastoma, 30 carcinoids, 10 pulmonary neuroendocrine tumors, 20 gastrointestinal tract neuroendocrine tumors, 3 Ewing tumors and 8 pancreatic islet cell tumors.<sup>1</sup> In soft tissue tumors, no labelling was observed in 40 leiomyosarcomas, 25 rhabdomyosarcomas, 20 myxofibrosarcomas, 10 myxoid/round cell liposarcomas, 10 dedifferentiated liposarcomas, 20 solitary fibrous tumors, 20 synovial sarcomas, 30 dermatofibrosarcoma protuberans, 20 schwannomas, 20 malignant peripheral nerve sheath tumors, 10 clear cell sarcomas, 10 low-grade endometrial stromal sarcomas and 5 follicular dendritic cell sarcomas.<sup>3</sup>

---

## Français

### Code A4502

#### Intérêt

Pour diagnostic *in vitro*.

Polyclonal Rabbit Anti-Human CD 117, c-kit est destiné pour un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque le récepteur tyrosine kinase transmembranaire CD117/c-kit, situé dans les cellules souches hématopoïétiques, les mélanocytes, les mastocytes, les cellules de Cajal, les cellules germinales, les cellules basales de la peau, et l'épithélium canalaire mammaire. L'anticorps est un moyen approprié pour l'identification de plusieurs cancers exprimant le c-kit, y compris les maladies du mastocyte, la leucémie myéloïde aiguë (LMA), le carcinome pulmonaire à petite cellule (CPPC), et le sarcome d'Ewing, et il peut faciliter la différenciation entre des tumeurs stromales gastrointestinales (TSGI)<sup>1-4</sup> et d'autres tumeurs mésenchymales intra-abdominales. L'identification différentielle est facilitée par les résultats d'un panel d'anticorps. L'interprétation des résultats doit être réalisée uniquement par un professionnel agréé dans le contexte de l'historique clinique du patient et d'autres examens.

#### Synonymes

KIT; récepteur du facteur des cellules souche ; récepteur du facteur de croissance des mastocytes ; récepteur du facteur Steels ; p145(c-kit)

#### Résumé et explication

Le proto-oncogène *c-kit*, situé sur le chromosome 4 humain<sup>6</sup>, code un récepteur transmembranaire. CD117/c-kit, appartenant à la famille des récepteurs tyrosine kinase de classe III, famille qui comprend le récepteur du facteur 1 stimulant de colonie, et les récepteurs de type A et B du facteur de croissance dérivé de plaquette. La zone extracellulaire de ces récepteurs comprend cinq domaines semblables aux immunoglobulines où les deuxième et troisième boucles sont supposées être impliquées dans la fixation du ligand. Le domaine tyrosine kinase intracytoplasmique est divisé par un long insert hydrophile entre la zone de fixation ATP et le site actif de la phospho-transférase. L'activation du récepteur est accompagnée par la dimérisation du récepteur, la phosphorylation du substrat et l'autophosphorylation, l'endocytose du récepteur, l'activation des protéines kinases et phospholipases, et la transcription de proto-oncogènes divers.<sup>5</sup> Il a été montré que, généralement, la voie du récepteur tyrosine kinase c-kit est importante dans la croissance tumorale et la progression de plusieurs cancers<sup>4</sup> ainsi que dans les mutations du gène *c-kit* amenant à la phosphorylation (activation) du ligand-libre du tyrosine kinase c-kit, et sont considérés avoir un rôle pathogène central dans par ex. les tumeurs stromales gastro-intestinales.<sup>7</sup>

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection concernant les procédures IHC pour : 1) Principe de procédure, 2) Matériaux requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

#### Réactif fourni

Anticorps de lapin isolé par affinité et purifié au moyen de l'antigène-lié par chromatographie d'affinité de thiol AvidGel F activé et fourni à l'état liquide dans 0,05 mol/L Tris/HCl, 0,1 mol/L NaCl, 0,015 mol/L NaN, pH 7,2, 1% de l'albumine sérique bovine.

Concentration protéinique g/L: Voir l'étiquette sur le flacon.

#### Immunogène

Peptide correspondant aux acides aminés 963 à 976 à l'extrémité C-terminale cytoplasmique du c-kit<sup>1,5</sup>

#### Spécificité

Dans le transfert de type Western d'un extrait de carcinome pulmonaire à petite cellule, lignée cellulaire SY, qui sur-exprime l'ARNm du c-kit, l'anticorps marque une bande de 145 kD correspondante à la protéine c-kit. La bande marquée est plutôt étendue, de 120 à 155 kD. Une bande supplémentaire de 100 kD est aussi marquée.<sup>1</sup> Dans une autre étude appliquant un anticorps différent au c-kit, une protéine de 100 kD a également été marquée. Ce marquage a été aboli lorsque l'anticorps a été mis à incuber avec l'antigène peptide c-kit synthétique employé pour l'immunisation.<sup>5</sup>

En transfert de Western, l'anticorps n'a pas montré de réaction avec un extrait de lignée cellulaire d'adénocarcinome HS, ne présentant pas l'expression du gène *c-kit*.<sup>1</sup>

#### Matériaux requis, mais non fournis

Se référer aux Dako's *Instructions Générales relatives à la procédure de Marquage Immunohistochimique* et/ou aux instructions du système de détection.

#### Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, le NaN<sub>3</sub> peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.<sup>9,10</sup>
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les réactifs non utilisés doivent être éliminés conformément aux réglementations locales et nationales.

## Conservation

Conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que des échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

## Préparation de l'échantillon

### Coupes en paraffine

L'anticorps peut être utilisé pour marquer des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol. Le prétraitement des tissus par restauration de l'épitope par la chaleur est requis. Pour une restauration de l'épitope par la chaleur, les solutions suivantes s'avèrent efficaces : Target Retrieval Solution (code S1700) et 0,01 mol/L tampon Tris, 0,001 mol/L EDTA, pH 9,0. 0,01 mol/L tampon citrate, pH 6,0 réduit l'intensité du marquage. En outre, Target Retrieval Solution, High pH (code S3308) s'avère inefficace. Le prétraitement des tissus avec la Protéinase K détruit l'épitope. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure immunocytochimique suivante.

## Procédure d'immunomarquage

### Dilution

Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit (code A4502) peut être dilué entre 1:400 et 1:600 pour une application sur des coupes incluses en paraffine, fixées au formol de tumeur stromale gastro-intestinale, et faisant appel à 20 minutes de restauration de l'épitope par la chaleur dans Target Retrieval Solution (code S1700) et 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier. Le témoin négatif requis est Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid-Phase Absorbed, code X0936), dilué à la même concentration protéinique que l'anticorps primaire.

### Révélation

LSAB™+ HRP Kit (code K0679) et EnVision™ + HRP Kits (codes K4008 et K4010) sont requis. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.

### Automatisation

L'anticorps est bien approprié pour le marquage immunocytochimique utilisant des plate-formes automatisées, telles que Dako Autostainer.

## Interprétation du marquage

Le modèle de marquage cellulaire pour anti-CD117, c-kit est membranaire et/ou cytoplasmique.

## Caractéristiques de la Performance

### Tissus Normaux

L'anticorps marque l'épithélium du sein, les cellules basales de la peau (mélanocytes en apparence), les spermatozoïdes, les ovocytes, les mastocytes tissulaires, <sup>1</sup> les lignées cellulaires osseuses semblables aux fibroblastes et les cellules de Cajal intestinales.<sup>8</sup>

### Tissus Anormaux

L'anticorps a marqué 50 cas sur 56 de séminomes/dysgerminomes, 45 cas sur 123 de carcinomes à petite cellule du poumon, 3 cas sur 7 des tératomes immatures, 2 cas sur 11 d'anéocarcinomes ovariens papillaires séreux, 2 cas sur 14 de mélanomes malins de la peau, 2 cas sur 18 de neuroblastomes, 7 cas sur 86 de carcinomes cellulaires squameux pulmonaires, 1 cas sur 18 de carcinomes à cellule basale, 9 cas sur 227 de carcinomes cervicaux à cellule non-petite, 1 cas sur 35 d'adénocarcinomes pulmonaires et 1 cas sur 92 de carcinomes du sein.<sup>1</sup> L'anticorps a également été testé sur 365 sarcomes de tissus mous. Les tumeurs montrant occasionnellement une immunoréactivité, dans la plupart des cas de marquage focal, ont été les suivantes : 3 cas sur 5 de schwannomes mélanotiques, 5 cas sur 20 d'angiosarcomes, 4 cas sur 20 de mélanomes métastatiques, 4 cas sur 20 de sarcomes de Ewing/tumeurs neuro-ectodermes périphériques primitives malignes, 2 cas sur 10 de péri-neuriomes, et 2 cas sur 20 de chondrosarcomes myxoïdes extra-squelettiques. De rares cellules tumorales ont été marquées par l'anticorps dans 1 cas sur 10 de sarcomes fibro-myxoïdes à faible degré et 1 cas sur 20 de fibromatoses desmoïdes. Plus de 35 GIST consécutifs ont pu sur-exprimer c-kit lorsque examinés avec l'anticorps, des résultats confirmés par immunotransfert. Le marquage a été typiquement diffus et généralement fort dans ces tumeurs.<sup>3</sup> L'anticorps a marqué aussi les cellules souches de la moelle osseuse activées dans les biopsies de la moelle osseuse des cas de lymphomes malins infiltrants et d'ostéomyélites. Le marquage des cellules souches de la moelle osseuse activées a été plus hétérogène dans des cas d'anémie aplasique, de myélodysplasie et métastase de la prostate ou du cancer du sein.<sup>8</sup>

Aucun marquage n'a été observé dans 17 carcinomes pulmonaires à grande cellule, 5 carcinomes pulmonaires adénoquameux, 1 carcinome pulmonaire mucoépidermoïde, 2 carcinomes cervicaux du type à petite cellule, 9 carcinomes de la cellule claire ovariennes, 4 cystadénocarcinomes mucineux ovariens, 4 carcinomes endométriaux, 17 tumeurs de la cellule germinale excluant les séminomes/dysgerminomes et les tératomes immatures, 355 carcinomes des voies gastro-intestinales, 59 carcinomes du foie, 31 carcinomes du pancréas, 7 carcinomes de la vésicule biliaire, 16 carcinomes du canal biliaire, 29 carcinomes du rein, 49 carcinomes de la vessie urinaire, 159 carcinomes de la prostate, 14 carcinomes de la glande surrénale, 91 carcinomes de la thyroïde, 45 carcinomes de la peau, 7 ganglioneuromes, 23 phaeochromocytomes, 12 paragangliomes, 7 carcinomes médullaires de la thyroïde, 1 rétinoblastome, 30 carcinoïdes, 10 tumeurs neuroendocrines pulmonaires, 20 tumeurs neuroendocrines des voies gastro-intestinales, 3 tumeurs de Ewing et 8 tumeurs de la cellule des îlots de Langerhans pancréatiques <sup>1</sup>. Dans les tumeurs du tissu mou, aucun marquage n'a été observé dans 40 léiomyosarcomes, 25 rhabdomyosarcomes, 20 myxofibrosarcomes; 10 liposarcomes de la cellule myxoïde/arrondie, 10 liposarcomes différenciés, 20 tumeurs fibreuses solitaires, 20 sarcomes synoviaux, 30 derma-fibrosarcomes protuberans, 20 schwannomes, 20 tumeurs de la gaine du nerf périphérique malignes, 10 sarcomes de la cellule claire, 10 sarcomes stromaux endométriaux de faible degré et 5 sarcomes de la cellule dendritique folliculaire.<sup>3</sup>

---

## Deutsch

### Code A4502

#### Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit ist für die immunzytochemische Anwendung bestimmt. Der Antikörper markiert den transmembranösen Tyrosinkinase-Rezeptor CD117/c-kit, der in hämatopoietischen Stammzellen, Melanozyten, Mastzellen, Cajal-Zellen, Keimzellen, Basalzellen der Haut und Gangepithelien der Mamma vorkommt.<sup>1-5</sup> Der Antikörper kann ein nützliches Werkzeug für die Identifizierung mehrerer Krebsformen sein, die den c-kit exprimieren, einschließlich Mastzellenerkrankungen, akuter myeloider Leukämie (AML), kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) und Ewing-Sarkom, und kann die Differenzierung zwischen gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs) und anderen intraabdominalen mesenchymalen Tumoren unterstützen.<sup>1-4</sup> Die Differentialdiagnose wird durch die Resultate eines Antikörper-Panels unterstützt. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

#### Synonyme

KIT; Stammzellenfaktor-Rezeptor; Mastzellen-Wachstumsfaktor-Rezeptor; Steelfaktor-Rezeptor; p145(c-kit)

#### Zusammenfassung und Erläuterung

Der protoonkogene *c-kit*, der auf dem humanen Chromosom 4 lokalisiert ist,<sup>6</sup> kodiert einen Transmembran-Rezeptor, CD117/c-kit, der zur Rezeptortyrosinkinase-Familie der Klasse III gehört, welche den Rezeptor für den koloniestimulierenden Faktor 1 und die plättchenabgeleiteten Wachstumsfaktorrezeptoren der Typen A und B einschließt. Die extrazelluläre Region dieser Rezeptoren besteht aus fünf immunglobulinähnlichen Domänen, deren zweite und dritte Schleifen vermutlich an der Ligandenbindung beteiligt sind. Die intrazytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne wird durch einen langen hydrophilen Einschub zwischen der ATP-bindenden Region und der phosphotransferaseaktiven Seite gespalten. Die Rezeptoraktivierung wird von der Rezeptordimerisierung, Substratphosphorylierung und -autophosphorylierung, Rezeptorinternalisierung, Aktivierung der Proteinkinasen und Phospholipasen und Transkription verschiedener Protoonkogene begleitet.<sup>5</sup> Im Allgemeinen hat sich die Bedeutung des c-kit Tyrosinkinase-Rezeptor-Pfads für das Tumorstadium und seine Progression in mehreren Krebsen<sup>4</sup> und Mutationen im *c-kit*-Gen gezeigt. Er führt zu einer ligandenunabhängigen Phosphorylierung (Aktivierung) der c-kit-Tyrosinkinase und es wird angenommen, dass er eine zentrale pathogenetische Rolle beispielsweise in gastrointestinalen Stromatumoren spielt.<sup>7</sup>

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzipien, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlerbehebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

#### Geliefertes Reagenz

Affinitätsisolierter Kaninchenantikörper, der mittels antigengebundener, aktivierter Thiol-Avidin-Gel-F-Affinitätschromatographie gereinigt wurde und in flüssiger Form in 0,05 mol/L Tris/HCl, 0,1 mol/L NaCl, 0,015 mol/L Na<sub>3</sub>, pH 7,2, 1% bovinem Serumalbumin vorliegt.

Protein-Konzentration g/L: Siehe Produktetikett.

#### Immunogen

den Aminosäuren 963 bis 976 am zytoplasmatischen C-terminalen Teil des c-kit entsprechendes Peptid<sup>1,5</sup>

#### Spezifität

Im Westernblotting eines Extrakts der kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinie SY, die c-kit-mRNA überexprimiert, markiert der Antikörper eine dem c-kit-Protein entsprechende Bande von 145 kD. Die markierte Bande ist ziemlich breit und reicht von 120 bis 155 kD. Eine zusätzliche Bande von 100 kD wird ebenfalls markiert.<sup>1</sup> In einer anderen Studie mit einem unterschiedlichen Antikörper gegen c-kit wurde ein 100-kD-Protein auf dieselbe Weise markiert. Diese Markierung verschwand, wenn der Antikörper mit dem für die Immunisierung verwendeten synthetischen c-kit-Peptidantigen inkubiert wurde.<sup>5</sup>

Beim Westernblotting reagierte der Antikörper nicht mit einem Extrakt der Adenokarzinom-Zelllinie HS, die keine *c-kit*-Genexpression aufweist.<sup>1</sup>

#### Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs)

Siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako und/oder Anweisungen des Detektionssystems.

#### Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (Na<sub>3</sub>), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Na<sub>3</sub> können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.<sup>9,10</sup>
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

#### Aufbewahrung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

## **Probenvorbereitung**

### **Paraffinschnitte**

Der Antikörper kann für die Markierung paraffineingebetteter, formalinfixierter histologischer Schnitte verwendet werden. Es wird eine Vorbehandlung der Gewebe mit hitze-induziertem Epitope-Retrieval empfohlen. Für das hitze-induzierte Epitope Retrieval wurden die folgenden Lösungen als wirksam befunden: Target Retrieval Solution (Kode S1700) und 0,01 mol/L Tris-Puffer, 0,001 mol/L EDTA, pH 9,0. 0,01 mol/L Citratpuffer, pH 6,0, verringerte die Färbintensität. Zusätzlich wurde Target Retrieval Solution, hoher pH (Kode S3308) als nicht wirksam befunden. Vorbehandlung der Gewebe mit Proteinase K zerstörte das Epitop. Während der Gewebebehandlung oder der anschließenden immunzytochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

## **Färbeprozedur**

### **Verdünnung**

Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit (Kode A4502) kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:400 bis 1:600 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte gastrointestinaler Stromatumoren genutzt wird und wenn 20 Minuten lang das hitze-induzierte Epitope Retrieval mit Target Retrieval Solution (Kode S1700), gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist *Rabbit Immunoglobulin Fraction* (Solid-Phase Absorbed, Kode X0936), das auf eine Proteinkonzentration verdünnt wurde, die identisch mit derjenigen des primären Antikörpers ist.

### **Visualisierung**

LSAB™ + HRP Kit (Kode K0679) und EnVision™ + HRP Kits (Kodes K4008 und K4010) werden empfohlen. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genutzten Kits für die Visualisierung erläutert wird.

### **Automatisierung**

Der Antikörper ist gut für das immunzytochemische Färben unter Nutzung automatisierter Plattformen wie beispielsweise des „Autostainer“ von Dako geeignet.

## **Bewertung der Färbung**

Das zelluläre Färbemuster für Anti-CD117, c-kit ist membrangebunden und/oder zytoplasmatisch.

## **Leistungseigenschaften**

### **Normalgewebe**

Der Antikörper markiert Mammaepithel, Hautbasalzellen (anscheinend Melanozyten), Spermatozyten, Oozyten, Gewebemastzellen,<sup>1</sup> fibroblastenähnliche Knochenhautzellen<sup>8</sup> und intestinale Cajal-Zellen.

### **Anomale Gewebe**

Der Antikörper markierte 50/56 Seminomen/Dysgerminomen, 45/123 kleinzelligen Karzinomen der Lunge, 3/7 unreifen Teratomen, 2/11 serösen papillären Ovaradenokarzinomen, 2/14 malignen Melanomen der Haut, 2/18 Neuroblastomen, 7/86 pulmonalen Plattenzellkarzinomen, 1/18 Basalzellkarzinomen, 9/227 nicht kleinzelligen Cervixkarzinomen, 1/35 pulmonalen Adenokarzinomen und 1/92 Mammakarzinomen.<sup>1</sup> Der Antikörper wurde ebenfalls auf 365 Weichteilsarkomen getestet. Tumoren, die eine gelegentliche Immunreaktivität mit mehrheitlich fokaler Markierung zeigten, waren 3/5 melanotischen Schwannomen, 5/20 Angiosarkomen, 4/20 metastatischen Melanomen, 4/20 Ewing-Sarkomen/malignen primitiven peripheren neuroektodermalen Tumoren, 2/10 Perineuriomen, 2/20 extraskeletalen myxoiden Chondrosarkomen. Vereinzelt Tumorzellen wurden vom Antikörper in 1/10 geringgradigen fibromyxoiden Sarkomen und 1/20 desmoiden Fibromatosen markiert. Mehr als 35 aufeinander folgende GISTs zeigten eine Überexpression des c-kit bei der Untersuchung mit dem Antikörper. Diese Ergebnisse wurden durch Immunblotting bestätigt. Die Markierung in diesen Tumoren war typischerweise diffus und allgemein stark.<sup>3</sup> Der Antikörper markierte ebenfalls aktivierte Knochenmarkstammzellen in Knochenmarkbiopsien aus Fällen infiltrierender maligner Lymphome und Osteomyelitis. Die Markierung der aktivierten Knochenmarkstammzellen war heterogener in Fällen von aplastischer Anämie, Myelodysplasie und Metastasen von Prostata- oder Brustkrebs.<sup>8</sup>









In den folgenden Fällen wurde keine Markierung beobachtet: 17 großzellige pulmonale Karzinome, 5 adenosquamöse pulmonale Karzinome, 1 mukoepidermoides pulmonales Karzinom, 2 kleinzellige zervikale Karzinome, 9 Ovar-Klarzellenkarzinome, 4 muzinöse Ovar-Zystadenokarzinome, 4 Endometriumkarzinome, 17 Keimzelltumoren, ausgenommen Seminome/Dysgerminome und unausgereifte Teratome, 355 Gastrointestinaltrakt-Karzinome, 59 Leberkarzinome, 31 Pankreaskarzinome, 7 Gallenblasenkarzinome, 16 Gallengangkarzinome, 29 Nierenkarzinome, 49 Harnblasenkarzinome, 159 Prostatakarzinome, 14 Nebennierenkarzinome, 91 Thyroideakarzinome, 45 Hautkarzinome, 7 Ganglioneurome, 23 Phäochromozytome, 12 Paragangliome, 7 medulläre Schilddrüsenkarzinome, 1 Retinoblastom, 30 Karzinoide, 10 pulmonale neuroendokrine Tumoren, 20 neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts, 3 Ewing-Tumoren und 8 pankreatische Inselzelltumoren.<sup>1</sup> In den folgenden Weichteiltumoren wurde keine Färbung beobachtet: 40 Leiomyosarkome, 25 Rhabdomyosarkome, 20 Myxofibrosarkome, 10 myxoid/rundzellige Liposarkome, 10 dedifferenzierte Liposarkome, 20 solitäre fibröse Tumoren, 20 Synovialsarkome, 30 Fälle von Dermatofibrosarkom protuberans, 20 Schwannome, 20 maligne periphere Nervenscheidentumoren, 10 Klarzellsarkome, 10 niedrig maligne endometriale Stromasarkome und 5 follikuläre Dendritenzellsarkome.<sup>3</sup>

**References**

**Références**

**Literatur**

1. Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, Igarashi S, Shimamura K, Fukuda T, et al. Preferential localization of *c-kit* product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 1994; 424:135-41
2. van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, di Paola ED, Dimitrijevic S, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001; 358: 1421-3
3. Hornick JL, Fletcher CDM. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:188-93
4. Smithey BE, Pappo AS, Hill DA. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immuno-histochemical study. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:486-92
5. Bühring H-J, Ashman LK, Gattei V, Kniep B, Larregina A, Pinto A, et al. CR2.7. Stem-cell factor receptor (p145(*c-kit*)) summary report (CD117). In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. *Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 1882-8*
6. Yarden Y, Kuang W-J, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987; 6:3341-51
7. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohisto-chemical, and molecular genetic features and differential diagnosis (review). *Virchows Arch* 2001; 438:1-12
8. Huss R, Moosmann S. The co-expression of CD117 (*c-kit*) and osteocalcin in activated bone marrow stem cells in different diseases. *Br J Haematol* 2002; 118:305-12
9. Center for Disease Control Manual Guide–Safety Management, No. CDC-22, Atlanta, GA. “Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts.” April 30, 1976
10. Department of Health, Education and Welfare, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. “Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides.” DHHS (NIOSH) Publ. No. 78-127, Current 13. August 16, 1976

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Consult instructions for use <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> <i>Gebrauchsanweisung beachten</i>
 Manufacturer Fabricant Hersteller	 Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
 Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU	 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	

PT0039/Rev C



Dako North America, Inc.  
6392 Via Real  
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655  
Fax 805 566 6688  
Technical Support 800 424 0021  
Customer Service 800 235 5763

**EC REP**

Dako Denmark A/S  
Produktionsvej 42  
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500  
Fax +45 4485 9595

www.dako.com