

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Auswirkungen des histologischen Grades und des
c-kit-Mutationsstatus auf das Proteinexpressionsprofil
kaniner kutaner Mastzelltumoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Patricia Schlieben, geb. Klose
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2013
Journal-Nr.: 3670

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Zweiter Gutachter: PD Dr. Michael Veit
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Cancer, Canis, mass spectrometry, mast cells, proteomics, tumours

Tag der Promotion: 25.06.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-333-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meinen Bruder und meine Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	2
1.1.1 Epidemiologie der Mastzelltumoren.....	2
1.1.2 Makroskopisches Erscheinungsbild.....	2
1.1.3 <i>Staging</i> und <i>Grading</i> kaniner Mastzelltumoren.....	3
1.1.4 Prognose.....	6
1.2 Pathogenese kaniner Mastzelltumoren.....	8
1.2.1 Stammzellfaktor-Rezeptor KIT	8
1.2.1.1 Aufbau und Funktion	8
1.2.1.2 Mutationen	10
1.2.1.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren als Therapieansatz.....	11
1.2.2 Weitere mögliche Mechanismen der Karzinogenese kaniner Mastzelltumoren.....	12
1.3 Globale Expressionsanalysen als explorativer Ansatz zur Erweiterung des Kenntnisstandes.....	14
1.4 Arbeitshypothesen.....	15
2 Wissenschaftliche Publikationen in Journals mit Peer-Review	16
2.1 Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumors.....	16
2.2 Tandem Duplication of KIT Exon 11 Influences the Proteome of Canine Mast Cell Tumours.....	22
3 Deklaration der eigenen Arbeit in den wissenschaftlichen Publikationen.....	28
3.1 Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumors.....	28
3.2 Tandem Duplication of KIT Exon 11 Influences the Proteome of Canine Mast Cell Tumours.....	28
4 Diskussion.....	29
4.1 Grad-Analyse	29

INHALT

4.1.1	Stressproteine	30
4.1.2	Motilitäts-assoziierte Proteine.....	31
4.1.3	Mastzell-Differenzierungs-Proteine.....	32
4.2	Mutationsanalyse	33
4.2.1	Motilitäts-assoziierte Proteine.....	34
4.2.2	Lipidmetabolismus.....	34
4.2.3	Extrazelluläre Serumproteine	35
4.3	Schlussfolgerungen aus beiden Analysen	36
5	Zusammenfassung.....	37
6	Summary.....	39
7	Referenzen	40
8	Veröffentlichungen	53
9	Danksagung.....	54
	Selbstständigkeitserklärung.....	55

Abkürzungsverzeichnis

2D-GE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
2D-DIGE	Zweidimensionale Differenzielle Gelelektrophorese
5-HT	5-Hydroxytryptamin
ACSBG1	<i>Long Chain Fatty Acid CoA-Ligase 1</i>
ACTB	Beta Actin
ACTR 2 / 3	Actin-Related Protein 2 / 3
AgNORs	Agyrophilic Nuclear Organizer Regions
AHSG	Fetuin A
ALB	Serumalbumin
ALOX15	Arachidonate 15-Lipoxygenase
ANXA 2 / 6	Annexin A2 / A6
APOA1	Apolipoprotein A1
ARP2/3	Actin-Related Protein 2/3
ATP	Adenosintriphosphat
CAPPA1	Capping Protein (Actin Filament) Muscle Z-line
CPNE1	Copine 1
ECF	Eosinophilen-Chemotaktischer Faktor
et al.	et alii
FGG	Fibrinogen Gamma Chain
hpf	high power field
HSPA9	Heat Shock Protein 9
IgE	Immunglobulin E
IGGC/D	Immunglobuline Gamma Heavy Chain C / D
Ki67	<i>Antigen identified by monoclonal antibody Ki67</i>
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor (CD117)
MCT	<i>(canine cutaneous) Mast Cell Tumor</i>
MZT	<i>(kaniner kutaner) Mastzelltumor</i>
NCF	Neutrophilen-Chemotaktischer Faktor

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDIA3	Protein Disulfide-Isomerase A3
(m)RNA	(messenger) Ribonucleic Acid
SCF	Stem Cell Factor
TCP1A / 1E	T-Complex Protein 1, Untereinheit A / E
TK	Tyrosinkinase
TKI	(small molecule) Tyrosine Kinase Inhibitors
TPSAB1	Tryptase Alpha / Beta 1
TSLC1	Tumor Suppressor in Lung Cancer 1
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
WDR1	WD Repeat Domain 1
WHO	World Health Organization

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
1	Klinisches <i>Staging</i> kaniner kutaner Mastzelltumoren nach den Richtlinien der <i>World Health Organization</i>	3
2	Histologisches <i>Grading</i> kaniner kutaner Mastzelltumoren nach Patnaik	4
3	Histologisches <i>Grading</i> kaniner kutaner Mastzelltumoren nach Kiupel	5

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Stammzellfaktor-Rezeptor KIT	9

1 Einleitung

Kutane Mastzelltumoren (MZT) gehören zu den häufigsten Hauttumoren des Hundes. Je nach histologischer Klassifikation werden zwei bzw. drei verschiedene Grade unterschieden. Dabei weisen die jeweils geringer-gradigen MZT (Grad 1 bzw. *low-grade* MZT) ein eher gutartiges biologisches Verhalten auf, das durch ein expansives Wachstum charakterisiert ist. Grad 3 bzw. *high-grade* MZT sind hingegen durch ein infiltratives Wachstum gekennzeichnet und die Hunde weisen auf Grund von Metastasen und Rezidiven eine stark reduzierte Überlebenszeit auf.

Trotz intensiver Forschung konnte bislang nicht entschlüsselt werden, welche Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene dieses unterschiedliche klinische Verhalten verursachen. Im Fokus stand lange der Stammzellefaktor-Rezeptor KIT, der im Falle von bestimmten Mutationen im Protoonkogen *c-kit* autophosphoryliert und nachfolgend Liganden-unabhängig aktiviert wird. Dies führt entsprechend den Effekten des unveränderten Rezeptorsystems zu einer gesteigerten Zellproliferation, Migration und unterdrückten Apoptose der mutierten Mastzellen. Allerdings konnten verschiedene unabhängige Untersuchungen nur bei etwa 12 % aller MZT bzw. 40 % der Grad 3 MZT Mutationen im Protoonkogen *c-kit* identifizieren. Somit bleibt die Frage offen, welche molekularbiologischen Veränderungen zum aggressiven Verhalten der hochmalignen Grad 3 Tumoren führen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mittels einer globalen, explorativen Analyse des Proteinexpressionsprofils von MZT mit unterschiedlichem histologischen Grad bzw. unterschiedlichem *c-kit*-Mutationsstatus, Hinweise auf die molekularbiologischen Ursachen für das klinische Verhalten der Tumoren und die Auswirkungen von *c-kit*-Mutationen zu erhalten. Die so gewonnenen Kenntnisse könnten sowohl zur weiteren Entschlüsselung der Karzinogenese kaniner kutaner Mastzelltumoren beitragen, als auch Anhaltspunkte für neue Therapiestrategien liefern.

1.1 Hintergrund

1.1.1 Epidemiologie der Mastzelltumoren

Da etwa 7-21 % aller kaninen Hauttumoren als kutane Mastzelltumoren (MZT) diagnostiziert werden, stellt diese Neoplasie den häufigsten Hauttumor des Hundes dar (Brodey, 1970; Finnie and Bostock, 1979; Priester, 1973; Rothwell et al., 1987). Laut einer englischen Studie aus dem Jahr 2002 werden jährlich etwa 129 MZT pro 100.000 Hunde diagnostiziert (Dobson et al., 2002). Dabei liegt das Durchschnittsalter zwischen 7,5 und 9 Jahren, auch wenn in Einzelfällen MZT bei Jungtieren diagnostiziert wurden. Eine Geschlechtsdisposition konnte bislang nicht sicher nachgewiesen werden. Dagegen fand sich eine besondere Rassedisposition für Boxer, Boston- und Bull-Terrier sowie Labrador Retriever (Bostock, 1973; Cook, 1969; Head, 1958; Hottendorf and Nielsen, 1969; Nielsen and Cole, 1958).

1.1.2 Makroskopisches Erscheinungsbild

Im Allgemeinen findet sich die überwiegende Mehrheit von MZT als solitäre Umfangsvermehrungen am Rumpf, gefolgt von den Gliedmaßen und dem Kopf-Hals-Bereich (Bostock, 1973; Brodey, 1970; Rabanal and Ferrer, 2002). Bei den prädisponierten Rassen scheinen die Hintergliedmaßen vermehrt betroffen zu sein (Baker-Gabb et al., 2003). In etwa 10 % der Fälle können auch primär multiple MZT beobachtet werden (Conroy, 1983; Hottendorf and Nielsen, 1967; Mullins et al., 2006; Rabanal and Ferrer, 2002).

Makroskopisch fallen MZT in erster Linie als unspezifische, in der Regel haarlose, kutane Umfangsvermehrungen auf, die jedoch in Abhängigkeit ihrer gespeicherten und freigesetzten Mediatoren eine ödematöse Schwellung und Entzündung des umliegenden Gewebes verursachen können. Diese Wirkungen können zum Teil auch sehr plötzlich durch die reine Manipulation der Umfangsvermehrung und nachfolgende Degranulation der Tumorzellen hervorgerufen werden (so genannte „Darier Zeichen“). So führt Histamin beispielsweise zu einer Vasodilatation und einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, während ECF und NCF als Eosinophilen- bzw. Neutrophilen-chemotaktische Faktoren wirken (Rabanal and Ferrer, 2002; Thamm and Vail, 2007). Histamin kann des Weiteren über eine Histamin-2-Rezeptor-vermittelte Steigerung der Salzsäureproduktion zu Magengeschwüren mit Blutungen und Meläna bis hin zur Perforation der Magenwand führen (Fox et al., 1990; Howard et al., 1969; Macy, 1986; Thamm and Vail, 2007). Auch ein gesteigerter Juckreiz ist auf vermehrt freigesetztes Histamin zurückzuführen, jedoch erfolgt diese Wirkung über Histamin-1-Rezeptoren (Snyder, 2012). Die Ausschüttung von Heparin kann zu schweren Blutungsneigungen führen und Fibroblasten-hemmende Zytokine können Wundheilungsstörungen verursachen (Dobson and Scase, 2007; Thamm and Vail, 2007).

Diese als paraneoplastische Syndrome bezeichneten „Begleiterscheinungen“ können somit zu schweren Störungen des Allgemeinbefindens führen und unter Umständen sogar vor der Entdeckung des eigentlichen Tumors zu Tage treten (Misdorp, 2004).

1.1.3 **Staging und Grading kaniner Mastzelltumoren**

Das klinische *Staging* kaniner MZT erfolgt nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization: WHO*) und ist von großer Bedeutung für die Therapie und Prognose des Patienten. In Abhängigkeit der Anzahl der MZT, ihrer Verschieblichkeit in der Haut, des Lymphknotenstatus und des Auftretens paraneoplastischer Syndrome werden fünf Stadien differenziert (Tabelle 1; Owen et al., 1980).

Tabelle 1: Klinisches *Staging* kaniner kutaner Mastzelltumoren nach den Richtlinien der *World Health Organization* (Owen et al., 1980)

Kanine Kutane Mastzelltumoren	
Stadium 0	Einzelner unvollständig entfernter Tumor der Dermis; ohne Lymphknotenmetastasen
a	mit systemischen Symptomen
b	ohne systemische Symptome
Stadium 1	Einzelner Tumor, auf die Dermis beschränkt; ohne Lymphknotenmetastasen
a	mit systemischen Symptomen
b	ohne systemische Symptome
Stadium 2	Einzelner Tumor, auf die Dermis beschränkt; mit Lymphknotenmetastasen
a	mit systemischen Symptomen
b	ohne systemische Symptome
Stadium 3	Multiple Tumoren der Dermis oder große, infiltrative Einzeltumoren; mit oder ohne Lymphknotenmetastasen
a	mit systemischen Symptomen
b	ohne systemische Symptome
Stadium 4	Tumoren mit Fernmetastasen oder Tumorrezidiv mit Metastasen

Fernmetastasen sind vorwiegend in den lokalen Lymphknoten, der Leber, der Milz und dem Knochenmark zu finden (Conroy, 1983; Thamm and Vail, 2007).

EINLEITUNG

Vom kutanen MZT abzugrenzen ist die systemische Mastozytose, bei der entartete Mastzellen vorwiegend im peripheren Blutstrom und diffus verteilt in Milz und Leber zu finden sind (Thamm and Vail, 2007).

Für das histologische *Grading* stehen mittlerweile zwei Klassifikationen zur Verfügung. Die heutzutage am weitesten verbreitete Einteilung nach A. K. Patnaik basiert auf dem histologischen Gesamtbild der Neoplasie. Sie berücksichtigt sowohl die Abgrenzbarkeit des gesamten Tumors von seiner Umgebung als auch den Differenzierungsgrad der einzelnen Tumorzellen sowie das Auftreten von Pleomorphien und Mitosefiguren (Patnaik et al., 1984). Insgesamt ergeben sich anhand dieser Parameter drei Differenzierungsgrade (Tabelle 2).

Tabelle 2: Histologisches *Grading* kaniner kutaner Mastzelltumoren nach Patnaik (Patnaik et al., 1984)

Kanine Kutane Mastzelltumoren	
Grad 1	Gut differenzierte, monomorphe Mastzellen mit runden Kernen und deutlicher Granula; keine/kaum Mitosefiguren; keine stromale Reaktion oder Nekrose; auf die Dermis begrenzt
Grad 2	Mäßig differenzierte, teils pleomorphe Mastzellen mit teils unregelmäßigen Kernen und mäßigem Granula-Gehalt; erhöhte Mitoserate (0-2/hpf); gelegentlich stromale Reaktionen wie Ödem, Blutung und Nekrose; auf Dermis und Subkutis begrenzt
Grad 3	Schlecht differenzierte, pleomorphe Mastzellen mit unregelmäßigen Kernen und wenig Granula; hohe Mitoserate (3-6/hpf); stromale Reaktionen wie Ödem, Blutung und Nekrose; Subkutis und tieferliegendes Gewebe infiltrierend

Seit 2010 steht auch ein von M. Kiupel etabliertes zweistufiges *Grading*-System zur Verfügung. Dieses konzentriert sich vorwiegend auf Malignitätskriterien auf zellulärer Ebene und berücksichtigt dabei die Mitoserate, den Gehalt an mehrkernigen Zellen sowie das Vorkommen bizarrer oder vergrößerter Nuclei (Kiupel et al., 2011). Folgende zwei Grade ergeben sich daraus (Tabelle 3).

Tabelle 3: Histologisches *Grading* kaniner kutaner Mastzelltumoren nach Kiupel (Kiupel et al., 2011)

Kanine Kutane Mastzelltumoren	
<i>Low-grade</i>	< 7 Mitosefiguren / 10 hpf; < 3 mehrkernige (≥ 3 Kerne) Zellen / 10 hpf; < 3 bizarre Nuclei / 10 hpf
<i>High-grade</i>	≥ 7 Mitosefiguren / 10 hpf; ≥ 3 mehrkernige (≥ 3 Kerne) Zellen / 10 hpf; ≥ 3 bizarre Nuclei / 10 hpf; Karyomegalie

Neben der routinemäßig durchgeführten Hämatoxylin-Eosin Färbung der histologischen Schnittpräparate sind Spezialfärbungen wie Toluidinblau oder Giemsa zur Verifizierung der Mastzellen auf Grund der ausgeprägten Metachromasie der Mastzellgranula hilfreich (Ehrlich, 1878; Huntley, 1992). Darüber hinaus reagieren MZT positiv auf Vimentin und α -Antitrypsin in der Immunhistologie (Mederle et al., 2010).

1.1.4 Prognose

Die Prognose eines erkrankten Hundes ist stark korreliert mit dem klinischen *Staging* und histologischen *Grading* des MZT. Zusammenfassend kann man dabei sagen, dass die mittlere Überlebenszeit mit steigender *Staging*- bzw. *Grading*-Klassifikation sinkt. So beobachteten Kiupel et al. bei Hunden mit *low-grade* MZT eine mittlere Überlebenszeit von mehr als zwei Jahren und bei *high-grade* MZT von weniger als vier Monaten (Kiupel et al., 2011). Nach den Angaben von Patnaik et al. überlebten 93 %, 47 % bzw. 6 % der Hunde mit Grad 1, Grad 2 bzw. Grad 3 MZT mehr als 1.500 Tage (Patnaik et al., 1984).

Ebenfalls korreliert wird die Prognose von MZT-Patienten mit so genannten Proliferationsmarkern, wie Ki67 (*Antigen identified by monoclonal antibody Ki67*) und AgNORs (*agyrophilic nuclear organizer regions*), deren verstärktes Auftreten auf einen schnell wachsenden Tumor hinweist (Madewell, 2001; Mukaratirwa, 2005).

Ki67 ist ein Protein des Zellkerns, welches in allen mitotisch aktiven Zellen exprimiert wird. Nach immunhistologischer Färbung werden die positiv markierten Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt und als so genannter „Ki67 Index“ dargestellt (Gerdes et al., 1984; Scholzen and Gerdes, 2000). Dabei konnten verschiedene Studien eine starke Korrelation zwischen einem hohen „Ki67 Index“ und dem Auftreten von MZT-Rezidiven bzw. Metastasen und einer erhöhten Mortalität feststellen (Scase et al., 2006; Webster et al., 2007). Allerdings erschweren fehlende Färbe- und Quantifizierungsstandards, wie etwa ein einheitlicher *cut-off*-Wert, den routinemäßigen Einsatz dieses sicherlich wertvollen prognostischen Faktors (Welle et al., 2008).

Bei AgNORs handelt es sich um Strukturen der Kernkörperchen, die aktiv an der ribosomalen RNA-Transkription beteiligt sind (Derenzini, 2000). Auf Grund ihrer Affinität zu Silbermolekülen können sie mittels Silber-Imprägnation lichtmikroskopisch dargestellt und ausgezählt werden (Ploton et al., 1986). Eine steigende Anzahl an AgNORs scheint dabei sowohl mit der Verdopplungszeit der Tumorzellen *in vitro* als auch mit der Wachstumsrate des Tumors *in vivo* zu korrelieren (Derenzini et al., 1990; Trere et al., 1997). Darüber hinaus konnte, ähnlich wie bei Ki67, eine Assoziation zwischen großen Mengen an AgNORs in den MZT-Zellen und einer erhöhten Mortalität, bzw. dem Auftreten von Tumorzrezidiven und Metastasen festgestellt werden (Scase et al., 2006; Webster et al., 2007).

Ein weiterer Aspekt, der in den vergangenen Jahren fokussiert wurde, ist die Bedeutung des Stammzellfaktor-Rezeptors KIT. Nicht nur Mutationen in seinem kodierenden Gen, sondern auch sein Expressionsmuster innerhalb der einzelnen Tumorzellen, stehen immer wieder im Mittelpunkt der MZT-Forschung. So zeigten Webster et al. dass eine zytoplasmatische KIT-Expression mit einem erhöhten Rezidivrisiko korreliert, wo hingegen ein rein membran-gebundenes Signal mit einer höheren Überlebensrate assoziiert ist (Webster et al., 2004).

Zusammenfassend muss jedoch gesagt werden, dass sich keiner der genannten prognostischen Faktoren bislang in der alltäglichen Routine der MZT-Diagnostik gegenüber dem histologischen *Grading* und klinischen *Staging* durchsetzen konnte (Webster et al., 2007; Welle et al., 2008).

Nicht zuletzt liegt dies möglicherweise auch an der Tatsache, dass -wie bei den meisten anderen Tumorarten auch- viele Details über die Entstehung und Differenzierung der MZT auf molekularbiologischer Ebene unbekannt sind. So zeigen MZT verschiedener Grade zwar sowohl ein unterschiedliches histologisches Bild als auch ein differenzielles klinisches Verhalten, doch welche Elemente auf genomischer oder proteinbiochemischer Ebene hierfür verantwortlich sind, ist weitgehend ungeklärt.

1.2 Pathogenese kaniner Mastzelltumoren

In den vergangenen Jahrzehnten wurden große Fortschritte bei der Erforschung und Entschlüsselung der Grundlagen der Karzinogenese vor allem humaner Tumorarten gemacht. Insbesondere in der Veterinärmedizin ist jedoch bis heute für fast alle Tumorarten nicht abschließend geklärt, worin sich benigne und maligne Tumoren molekularbiologisch unterscheiden. Kenntnisse über diese Unterschiede könnten jedoch nicht nur die Diagnostik und Prognosestellung von Tumoren erleichtern, sondern auch neue Anhaltspunkte für Therapiestrategien liefern.

Im Bereich der MZT wurde in den vergangenen Jahren große Hoffnung auf den Stammzellfaktor-Rezeptor KIT gelegt, der offensichtlich zur Proliferation von Mastzellen beiträgt (Tsai et al., 1991).

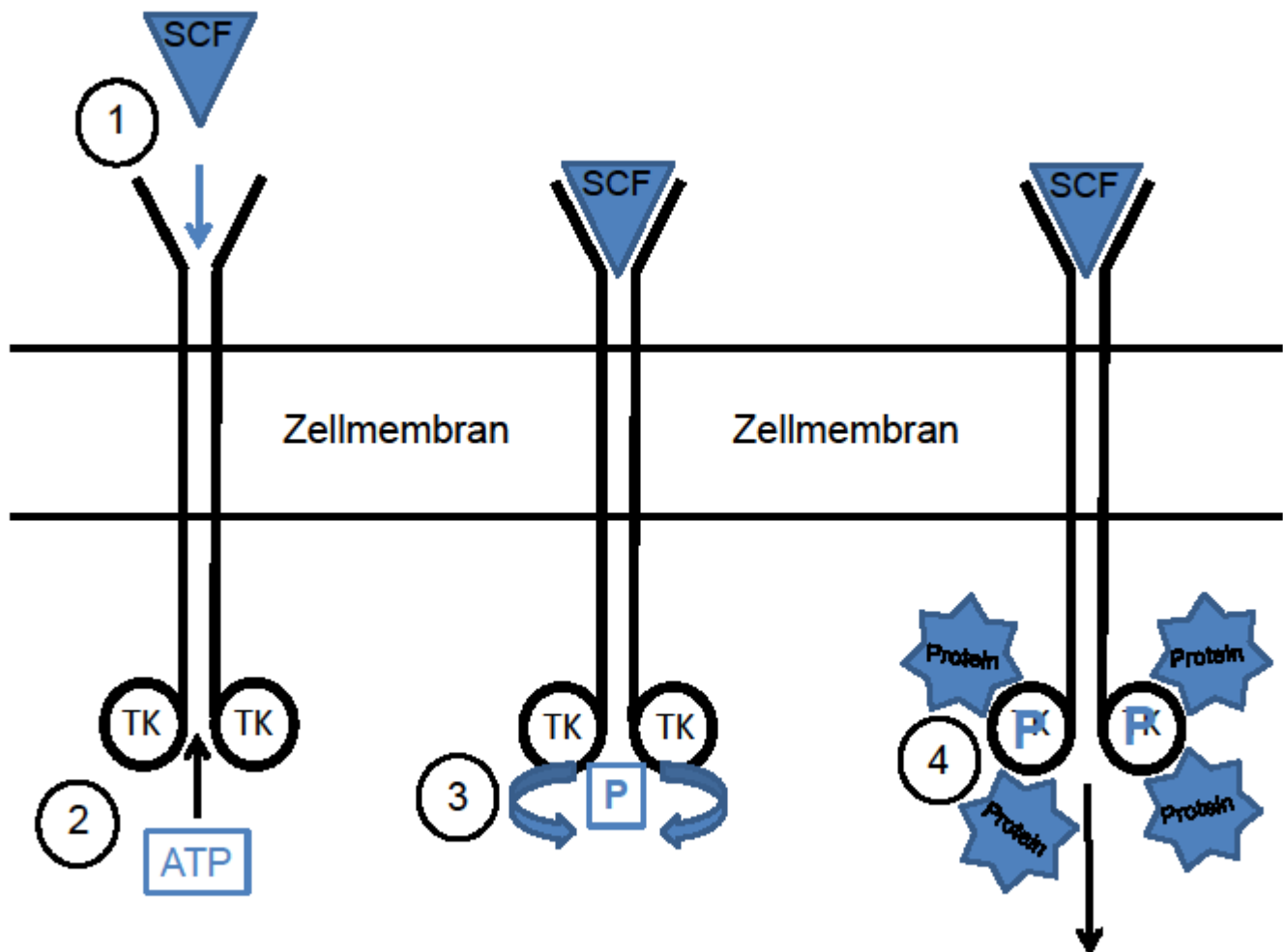
1.2.1 Stammzellfaktor-Rezeptor KIT

Beim Stammzellfaktor-Rezeptor KIT (CD117) handelt es sich um eine Tyrosinkinase, die in der Zellmembran verschiedenster Zellen vorkommt (Roskoski, 2005). Hierzu zählen neben den Mastzellen auch basophile Granulozyten, Melanozyten und hämatopoetische Stammzellen sowie Zellen der Plazenta und des Gehirns (Arber et al., 1998). Kodiert wird das Protein KIT vom so genannten Protoonkogen c-kit (Columbo et al., 1992; Yarden et al., 1987). Ligand des Rezeptors ist der Stammzellfaktor (Columbo et al., 1992; Tsai et al., 1991).

1.2.1.1 Aufbau und Funktion

Der Stammzellfaktor-Rezeptor KIT ist ein Protein aus der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Er besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne und durchspannt so in seiner Gesamtheit die Zellmembran (Letard et al., 2008; Yarden et al., 1987). Nach Bindung des Stammzellfaktors an der extrazellulären Domäne kommt es zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase durch die Bindung von Adenosintriphosphat (ATP). Nach anschließender Autophosphorylierung können verschiedene Proteine an der zytoplasmatischen Domäne binden und ebenfalls aktiviert werden (Abbildung 1; Letard et al., 2008). Zu den Effekten dieses Rezeptorsystems zählen unter anderem die Zellproliferation und Zellreifung, aber auch die Migration und Degranulation von Zellen sowie die Unterdrückung der Apoptose (Columbo et al., 1992; Meininger et al., 1992; Tsai et al., 1991; Yee et al., 1994).

- (1) Bindung des Stammzellfaktors (SCF)
- (2) Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase (TK) durch Bindung von Adenosintriphosphat (ATP)
- (3) Autophosphorylierung der Tyrosinkinase
- (4) Proteinbindung und -aktivierung am phosphorylierten Tyrosinrest



Effekte durch aktivierte Proteine:

- ✓ Zellproliferation und -reifung
- ✓ Zellmigration
- ✓ Zelldegranulation
- ✓ Unterdrückung der Apoptose

Abbildung 1: Stammzellfaktor-Rezeptor KIT: Aktivierung und Autophosphorylierung der Tyrosinkinase mit nachfolgenden Effekten auf weitere Proteine

(modifiziert nach G. A. Spinass und P. U. Heitz:

<http://www.megru.uzh.ch/i3/module/endokrinologie/endo.php?unild=E12610&di=10&v1=210>)

1.2.1.2 Mutationen

Mutationen des Protoonkogen c-kit können zu einer Autophosphorylierung und einer nachfolgenden Daueraktivierung des Rezeptors führen (Furitsu et al., 1993; London et al., 1999; Ma et al., 1999b). Dabei handelt es sich vorrangig um eine Tandemduplikation im Exon 11. Dieses kodiert gemeinsam mit dem Exon 12 für einen Teil der zytoplasmatischen Domäne des Tyrosinkinase-Rezeptors (Letard et al., 2008; London et al., 1999). Daneben wurden jedoch auch aktivierende Mutationen in den Exonen 8 und 9 verifiziert, welche für einen Teil der extrazellulären Domäne kodieren (Letard et al., 2008).

Entsprechend den Effekten des nicht-mutierten Tyrosinkinase-Rezeptors führt die permanente, Mutations-bedingte, Liganden-unabhängige Aktivierung zu einer gesteigerten Zellproliferation, Migration und unterdrückten Apoptose der mutierten Zellen (Furitsu et al., 1993; London et al., 1999; Ma et al., 1999a). MZT mit Mutation im Exon 11 des Protoonkogen c-kit sollten dementsprechend ein, im Vergleich zu Tumoren ohne Mutation, aggressiveres klinisches Verhalten zeigen. Statistisch signifikante, Grad-unabhängige Korrelationen zwischen Metastasierungsrate bzw. Rezidivrisiko und c-kit-Mutationsstatus konnten jedoch bislang nicht sicher bestätigt werden (Downing et al., 2002; Giantin et al., 2012; Zemke et al., 2002).

Darüber hinaus konnten in verschiedenen Studien nur bei etwa 12 % aller MZT bzw. 40 % der Grad 3 MZT überhaupt Tandemduplikationen im Exon 11 identifiziert werden (Letard et al., 2008; Webster et al., 2007; Zemke et al., 2002). Dies wiederum wirft die Frage auf, welche anderen molekularbiologischen Aspekte zum aggressiven Verhalten der hochmalignen Grad 3 Tumoren führen.

Unbekannt ist darüber hinaus auch, wie sich die Mutation im Protoonkogen c-kit auf das Proteinexpressionsprofil der Tumorzellen auswirkt. Da sie zumindest in einem gewissen Anteil der MZT das klinische Verhalten zu beeinflussen scheint, könnte beispielsweise eine verstärkte Expression von Proliferations-assoziierten Proteinen angenommen werden.

1.2.1.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren als Therapieansatz

Zu den therapeutischen Maßnahmen der MZT-Behandlung gehören neben der chirurgischen Exzision, der Bestrahlung und der Chemotherapie seit einiger Zeit auch die Anwendung von so genannten Tyrosinkinase-Inhibitoren (*small molecule tyrosine kinase inhibitors*, TKI; Liao et al., 2002; Mayer, 2006; Taylor et al., 2009). Trotz der geringen Prävalenz der Mutationen im Protoonkogen c-kit in der Gesamtheit der MZT hat die pharmakologische Hemmung der Tyrosinkinase bei Patienten mit Tumoren mit c-kit-Mutation teils therapeutische Erfolge gezeigt (Hahn et al., 2008; London et al., 2003).

TKI fungieren in der Regel als kompetitive Inhibitoren, indem sie die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase reversibel oder irreversibel blockieren. Nachfolgend unterbleibt dadurch die Autophosphorylierung der Kinase sowie alle weiteren Effekte auf zellulärer Ebene (Shchemelinin et al., 2006).

Eine aktuelle Studie untersuchte den Effekt von TKI an einer C2-Mastzelltumorzelllinie, welche durch eine Tandemduplikation im Exon 11 des Protoonkogen c-kit charakterisiert ist (Klopfleisch et al., 2012). Eine 24 bzw. 72 Stunden andauernde Behandlung der Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor „Masitinib“ führte zu einer massiven Veränderung des mRNA-Expressionsprofils der behandelten Zellen. Während die Mehrzahl der Gene des aktiven Genoms eine reduzierte Expression nach Behandlung zeigten, konnte für Gene verschiedener, die Zellproliferation aktivierenden Signalkaskaden eine erhöhte mRNA-Expression gezeigt werden. Das Proteinexpressionsprofil der behandelten Zellen wies hingegen nur minimale Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf, was möglicherweise durch die verzögerte Auswirkung der genomischen Veränderungen auf die Proteinebene erklärt werden könnte (Klopfleisch et al., 2012).

In klinischen Studien zur Wirksamkeit von TKI in der Therapie von MZT konnte ein besseres Ansprechen von Hunden mit MZT mit c-kit-Mutation auf die TKI-Behandlung beobachtet werden (Hahn et al., 2008; London, 2009; London et al., 2003). Hunde dieser Gruppe zeigten ein langsames Fortschreiten der Erkrankung bzw. eine verlängerte Überlebenszeit. Doch auch Patienten ohne c-kit-Mutation sprachen in einigen Fällen auf die TKI-Behandlung an. Hierbei geht man davon aus, dass die Wirkung über weitere Tyrosinkinasen erfolgte, die durch den Einsatz der Inhibitoren ebenfalls blockiert waren. Im Vordergrund stehen dabei der *platelet-derived growth factor*-Rezeptor (PDGFR) und der *vascular endothelial growth factor*-Rezeptor (VEGFR), die ebenfalls, wenn auch weniger stark, durch TKI gehemmt werden. Da auch sie an der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung bzw. der Angiogenese beteiligt sind, wirkt sich ihre Hemmung vermutlich ebenfalls negativ auf das Tumorstadium aus (Hahn et al., 2008; London, 2009; London et al., 2003).

1.2.2 Weitere mögliche Mechanismen der Karzinogenese kaniner Mastzelltumoren

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ist ein wichtiger Regulator der Angiogenese und darüber hinaus als autokriner Wachstumsfaktor bei verschiedenen Tumorarten beschrieben (Shinkaruk et al., 2003; Siemeister et al., 1998). Auch in MZT konnte eine Expression immunhistochemisch detektiert werden, wobei eine direkte Beeinflussung des Wachstums einer C2-MZT-Zelllinie durch VEGF nicht nachgewiesen werden konnte (Rebuzzi et al., 2007). Da ruhende und aktivierte Mastzellen jedoch keine VEGF-Expression zeigen, könnte die *de novo*-Expression von VEGF möglicherweise Einfluss auf die Karzinogenese von Mastzellen haben (Mederle et al., 2010).

Das Tumorsuppressorgen *tumor suppressor in lung cancer 1* (TSLC1) kodiert für ein Adhäsionsmolekül, das von normalen Mastzellen exprimiert wird. Humanmedizinische Studien deckten eine Korrelation zwischen einer reduzierten Expression und einer schlechten Prognose in Lungen-, Brust- und Prostata-Tumoren auf (Fukuhara et al., 2002; Heller et al., 2007; Ito et al., 2003; Kuramochi et al., 2001). Eine ähnliche negative Korrelation zwischen Tumorgrad und Expressionsintensität konnte auch an kaninen MZT aufgedeckt werden. Diese Beobachtungen sprechen für einen direkten Zusammenhang zwischen dem Funktionsverlust des Tumorsuppressors und der Progression von MZT (Taylor et al., 2010).

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) zählt unter anderem als vasoaktives Amin zu den primären Mediatoren der Mastzellgranula. Es wirkt über Serotonin-Rezeptoren (5-HT-Rezeptoren) allerdings auch auf eine Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen im Organismus, wie etwa den Blutdruck, die Blutgerinnung und die Verdauung. Obwohl verschiedene humanmedizinische Studien eine Korrelation zwischen mäßig bis schlecht differenzierten Tumoren und einer verstärkten Expression von 5-HT bzw. seinem Rezeptor aufdecken konnten, zeigten Untersuchungen an kaninen MZT einen gegenteiligen Effekt (Abrahamsson, 1999; Bollito et al., 2001; Fröberg et al., 2009). Hier nahm die Expression mit zunehmendem Tumorgrad ab (Fröberg et al., 2009). Ob diese Beobachtung die Ursache der mangelnden Differenzierung der höhergradigen MZT ist, oder ihre Folge, ist bis heute ungeklärt (Fröberg et al., 2009).

Tryptasen gehören ebenfalls zu den präformierten Mediatoren physiologischer Mastzellen, die bis zum Zeitpunkt ihrer Freisetzung in den Mastzellgranula gespeichert werden (Miller et al., 1990; Schwartz et al., 1981). Als Serinproteasen sind sie an der Spaltung von Peptiden und Proteinen beteiligt. Ihre Expression in humanen Mastzellen konnte in mehreren Studien immunhistologisch nachgewiesen werden (Walls et al., 1990; Yang et al., 2000). Eine veterinärmedizinische Untersuchung identifizierte eine Korrelation zwischen einem ansteigenden histologischen Grad kaniner MZT und einem abnehmenden Gehalt an zytoplasmatischer Granula (Simoes and Schoning, 1994). Darauf basierend vermuteten J. D. Webster und Kollegen immunhistochemisch detektierbare Expressionsunterschiede zwischen gut und schlecht differenzierten MZT. Obwohl drei verschiedene Tryptase-Expressionsmuster identifiziert werden konnten, zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zum klinischen Verhalten der Tumoren (Webster et al., 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass abgesehen von einigen Vermutungen wenige Details über die Karzinogenese der kaninen Mastzelltumoren bekannt sind. Der bislang praktizierte Ansatz, Beobachtungen aus der Humanmedizin auf die Veterinärmedizin zu übertragen, könnte dabei eine Ursache der mühsamen und oft ergebnislosen Suche nach den entscheidenden molekularbiologischen Bausteinen sein. Es empfiehlt sich daher der Einsatz explorativer globaler Analysemethoden auf genomischer oder proteinbiochemischer Ebene, die es ermöglichen, zunächst hypothesenfrei Unterschiede zwischen benignen und malignen Tumoren zu identifizieren.

1.3 Globale Expressionsanalysen als explorativer Ansatz zur Erweiterung des Kenntnisstandes

Während traditionelle, hypothesengestützte, wissenschaftliche Untersuchungen in der Regel nur die Expression einer einzelnen mRNA bzw. eines einzelnen Proteins beleuchten, zielt die globale Expressionsanalyse darauf ab, das mehr oder weniger gesamte Genom bzw. Proteom einer Gewebeprobe zu analysieren (Wilkins et al., 1996; Velculescu et al., 1997). Zur Verfügung stehen dabei Methoden wie Genchips oder Microarrays für die Analyse des Genoms. Das Proteom kann mittels Chromatographie oder Gelelektrophorese separiert und im Anschluss durch die Massenspektrometrie identifiziert werden. Nicht verwunderlich ist deshalb der zunehmende Einsatz solcher Methoden in der Humanmedizin, und neuerdings auch in der Veterinärmedizin. Beispielsweise wurde auf diese Weise der Einfluss eines Tyrosinkinase-Inhibitors auf eine C2-MZT-Zelllinie untersucht (Klopfleisch et al., 2012).

Ein wesentlicher Vorteil der direkten Analyse des Proteoms -im Gegensatz zum Genom- ist die Detektion posttranskriptioneller Modifikationen sowie die Bestätigung genomischer Veränderungen auf Proteinebene (Greenbaum et al., 2003).

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) ist eine gut etablierte Methode zur Separation von Proteinen. Durch die Verwendung von bis zu drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (2D-DIGE: zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese) ist darüber hinaus die Untersuchung mehrerer Gewebeproben im Vergleich möglich. Der Einsatz eines internen Standards, der auf jedes Gel aufgetragen wird und zu dem jede Probe ins Verhältnis gesetzt wird, ermöglicht die Reduktion von Einzelgelen und verringert Inter-Gel-Variationen (Klose, 1975; O'Farrell, 1975; Unlu et al., 1997). Insgesamt ist so eine vergleichende Analytik verschiedener Gewebegruppen möglich. Beispielsweise können Gesunde mit Kranken verglichen werden, aber auch benigne mit malignen Tumoren oder eben Tumoren von unterschiedlichem histologischen Grad bzw. mit unterschiedlichem c-kit-Mutationsstatus. Die anschließende Identifikation differenziell exprimierter Proteine mittels Massenspektrometrie gilt als gut etablierte Ergänzung dieser Analysemethode (Henzel et al., 1993; Hillenkamp et al., 1991; Mann et al., 1993).

1.4 Arbeitshypothesen

Die Differenzierung von Grad 1 und Grad 3 Mastzelltumoren erfolgt heutzutage weitestgehend anhand ihres histologischen Bildes. Die molekularbiologische Basis der morphologischen und klinischen Unterschiede dieser beiden Tumorgruppen ist jedoch größtenteils unbekannt. Neben neuen Erkenntnissen für das Grundlagenverständnis der Tumorbiologie könnte das Wissen über diese Unterschiede einen Ansatzpunkt für mögliche neue therapeutische Strategien darstellen.

Lange Zeit fokussierte sich die MZT-Forschung auf den Stammzellofaktor-Rezeptor KIT, der zwar im Falle einer Mutation an einer verstärkten Proliferation des Tumors beteiligt sein könnte, doch in der Mehrzahl der MZT nicht den alleinigen Auslöser der Karzinogenese darstellt. Nichtsdestotrotz fehlt eine globale Untersuchung von KIT-mutierten und nicht-mutierten MZT, da auch in diesem Fall die Ergebnisse Hinweise auf die Progression dieser besonderen Tumorgruppe liefern könnten.

Die vorliegende Studie sollte daher mittels zweidimensionaler differenzieller Gelelektrophorese (2D-DIGE) das Proteinexpressionsprofil von kaninen kutanen Mastzelltumoren verschiedener Grade und mit unterschiedlichem c-kit-Mutationsstatus identifizieren. Anschließend wurden differenziell exprimierte Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert.

Folgende Hypothesen standen im Fokus dieser Arbeit:

1. Grad 1 und Grad 3 Mastzelltumoren zeigen deutliche Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsprofil.
2. Mutationen im Protoonkogen c-kit führen zur verstärkten Expression von Proliferations-assoziierten Proteinen.

2 Wissenschaftliche Publikationen in Journals mit Peer-Review

2.1 Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumors

“Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumors”

The Veterinary Journal 2012 Nov; 194(2):210-4. doi:10.1016/j.tvjl.2012.04.002.

Epub 2012 May 10. PMID: 22578690

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.002>

2.2 Tandem Duplication of KIT Exon 11 Influences the Proteome of Canine Mast Cell Tumours

“Tandem Duplication of KIT Exon 11 Influences the Proteome of Canine Mast Cell Tumours”
Journal of Comparative Pathology 2013 May; 148(4):318-22. doi:10.1016/j.jcpa.2012.07.006.
Epub 2012 Aug 27. PMID: 22935087

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.07.006>

3 Deklaration der eigenen Arbeit in den wissenschaftlichen Publikationen

3.1 Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumors

Autoren: P. Schlieben, A. Meyer, C. Weise, A. Bondzio, R. Einspanier, AD Gruber, R. Klopfleisch

Jahr: 2012

Journal: *The Veterinary Journal* 2012 Nov; 194(2):210-4

Eigener Anteil an der Publikation: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, sowie Erstellung des Manuskripts.

Beiträge der Co-Autoren: Die Mutationsanalyse erfolgte durch A. Meyer. Die Proteinvisualisierung erfolgte in Kooperation mit A. Bondzio, die Proteinidentifikation in Kooperation mit C. Weise. Alle Co-Autoren beteiligten sich an der Interpretation der Daten.

3.2 Tandem Duplication of KIT Exon 11 Influences the Proteome of Canine Mast Cell Tumours

Autoren: P. Schlieben, A. Meyer, C. Weise, A. Bondzio, AD Gruber, R. Klopfleisch

Jahr: 2013

Journal: *Journal of Comparative Pathology* 2013 May; 148(4):318-22

Eigener Anteil an der Publikation: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, sowie Erstellung des Manuskripts.

Beiträge der Co-Autoren: Die Mutationsanalyse erfolgte durch A. Meyer. Die Proteinvisualisierung erfolgte in Kooperation mit A. Bondzio, die Proteinidentifikation in Kooperation mit C. Weise. Alle Co-Autoren beteiligten sich an der Interpretation der Daten.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Proteinexpressionsprofile kaniner kutaner Mastzelltumoren mit unterschiedlichen histologischen Graden und unterschiedlichem c-kit-Mutationsstatus zu vergleichen. Es wurde erwartet, dass die so identifizierten Ergebnisse zur weiteren Entschlüsselung der Karzinogenese der MZT beitragen und Anhaltspunkte für neue Therapieoptionen liefern könnten.

4.1 Grad-Analyse

Im ersten Teil der Arbeit wurden kanine kutane Mastzelltumoren (MZT) verschiedener Grade untersucht. Entsprechend der aktuellen histologischen *Grading*-Systeme handelte es sich dabei um jeweils fünf Grad 1 und Grad 3 MZT bzw. fünf *low-grade* und *high-grade* MZT (Kiupel et al., 2011; Patnaik et al., 1984). Mittels zweidimensionaler differenzieller Gelelektrophorese (2D-DIGE) wurden die Proteinexpressionsmuster beider Tumorgruppen visualisiert und miteinander verglichen. Statistisch signifikant differenziell exprimierte Proteine wurden im Anschluss mittels Massenspektrometrie identifiziert. Von insgesamt 1.552 visualisierbaren Proteinen erfüllten 32 die statistischen Kriterien ($fold-change > |1,5|$; $p < 0,05$), von denen 13 eindeutig identifiziert werden konnten. Unter ihnen fanden sich vorrangig so genannte Stressproteine, Zellmotilitäts-assoziierte Proteine und Mastzell-typische Differenzierungsproteine.

Warum insgesamt nur circa 2 % des visualisierbaren Proteoms statistisch signifikante Unterschiede aufwies, könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es an der Heterogenität der Tumorzellpopulation selbst liegen, zum anderen aber auch an der Methode der 2D-DIGE. Schließlich muss ein Protein, um als signifikant in seiner Expression verändert aufzufallen, in allen untersuchten Tumoren einer Gruppe gleichermaßen exprimiert sein. Eine solche Homogenität ist insbesondere von entdifferenzierten, pleomorphen Mastzelltumoren nicht zu erwarten.

Die auffallend geringen *fold-changes* zwischen den verschiedenen Tumorgruppen könnten im Hinblick auf weiterführende, möglicherweise weniger sensitive Untersuchungsmethoden wie die Immunhistologie Probleme bei der Validierung der Ergebnisse verursachen, sind jedoch mit anderen DIGE-Studien vergleichbar (Bartkowiak et al., 2009; Dowling et al., 2007; Klose et al., 2011; Schulz et al., 2009). Eine Identifikation von Proteinen, die ausschließlich in einer der beiden Tumorgruppen exprimiert werden, scheint mit der in dieser Studie verwendeten Methode nicht möglich zu sein.

4.1.1 Stressproteine

Weisen Zellen eine übermäßige Proliferation auf, können sie oft nicht mehr adäquat mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden und es kann zum Funktionsverlust bzw. Zelltod kommen. Nicht nur schnell wachsende Tumorzellen, die eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen, sondern auch nicht-neoplastische Zellen, schützen sich durch so genannte Stressproteine vor den Folgen solcher Mangelzustände (Davenport et al., 2008; Sherman and Multhoff, 2007).

Vier Proteine mit bekannter Assoziation zur Zellstress-Reduktion zeigten in den Grad 3 MZT eine verstärkte Expression. Zu ihnen zählten das *heat shock protein 9* (HSPA9, mortalin), die *protein disulfide-isomerase A3* (PDIA3) und zwei Untereinheiten des *T-complex protein 1*, TCP1A und TCP1E.

PDIA3 ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und agiert während der Neusynthese von Glykoproteinen als Chaperon (Ni and Lee, 2007; Pressinotti et al., 2009). Eine verstärkte Expression sowie ein nachfolgender anti-apoptotischer Effekt wurden nach Stress-Induktion in einer Melanom-Zelllinie beobachtet (Corazzari et al., 2007; Ni and Lee, 2007). Auch HSPA9 fungiert als Chaperon und soll eine fehlerhafte Faltung von mitochondrialen Proteinen verhindern (Burbulla et al., 2010). In humanen Lungentumoren sowie in humanen Lymphomzellen wurden ebenfalls verstärkte HSPA9-Expressionen detektiert (Grills et al., 2011; Weinkauf et al., 2009).

Insgesamt entsprechen die vorliegenden Ergebnisse den Resultaten anderer Studien und dem derzeitigen Wissensstand über die gesteigerte Stress-Resistenz von Tumorzellen durch die verstärkte Expression von Stressproteinen (Foster et al., 2009; Guo et al., 2010; Huang et al., 2010; Luk et al., 2006; Zanini et al., 2008). Da auch in einem schnell wachsenden Mastzelltumor von einem Nährstoff- und Sauerstoffmangel ausgegangen werden muss, erscheint eine Überexpression von Stressproteinen in diesen Tumorzellen durchaus relevant.

Ob sich die identifizierten Proteine als mögliche neue therapeutische *targets* zur pharmakologischen Hemmung und nachfolgenden Unterdrückung des Tumorwachstums eignen, muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

4.1.2 Motilitäts-assoziierte Proteine

Eine gesteigerte Zellmotilität ist ein Hauptmerkmal für maligne, metastasierende Tumorzellen. Ein Umbau des Zytoskeletts ist dafür ebenso nötig wie die Lösung und Haftung von Protein-Protein-Interaktionen.

Fünf Zellmotilitäts-assoziierte Proteine konnten in der Grad-Analyse identifiziert werden, von denen drei eine verstärkte und zwei eine verminderte Expression in den Grad 3 MZT zeigten. Bei den drei überexprimierten Proteinen handelte es sich um das *actin-related protein 3* (ACTR3), *WD repeat domain 1* (WDR1) und *annexin A6* (ANXA6). *Annexin A2* (ANXA2) und *beta actin* (ACTB) waren herunter reguliert.

Die gegensätzliche Regulation der beiden Annexine ist im Hinblick auf den Kenntnisstand über ihre jeweiligen Funktionen durchaus schlüssig. ANXA2 beispielsweise dient als Bindungspartner für extrazelluläre Matrixproteine und ist an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Sein Verlust ging daher in nasalen Adenokarzinomen mit einer Zerstörung der Epithelbarriere und einer gesteigerten Ausbreitung von Tumorzellen in die Umgebung einher (Hayes et al., 2006; Rodrigo et al., 2011; Waisman, 1995). Darüber hinaus wurden verminderte ANXA2-Konzentrationen in humanen Prostata-, Ösophagus- und Kopf-Hals-Karzinomen detektiert (Chetcuti et al., 2001; Pena-Alonso et al., 2008; Zhi et al., 2003). ANXA6 hingegen unterstützt als Calcium-abhängiges Membran- und Phospholipid-bindendes Protein die Reorganisation der Plasmamembran, die Zelladhäsion sowie die Zellmotilität (Crocì et al., 2010; Sakwe et al., 2011). Der Verlust von ANXA6 ging in humanen Brustkrebszellen mit einer verminderten Zellmotilität und Invasivität einher (Sakwe et al., 2011).

Auch WDR1 dient als zytoskeletales Protein der Remodellierung von Aktin und ist an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Kim et al., 2009; Wang et al., 2009). Über die Aktivierung von Cofilin und die Beschränkung der Zellmembranvorstülpung in eine Richtung unterstützt WDR1 die gerichtete Zellmigration (Kato et al., 2008).

ACTR3 ist als Bestandteil des ARP2/3-Komplexes ebenfalls essentiell für die Organisation des Zytoskeletts (Kaneda et al., 2004). Über die Regulation so genannter Lamellipodien ist es darüber hinaus an der Zellmotilität beteiligt (Bryce et al., 2005). Verstärkte ARP2/3-Komplex-Signale in humanen, invasiven Brustkrebszellen unterstützen die Hypothese, dass dieser Proteinkomplex die Zellmigration und Invasion verstärkt (Yokotsuka et al., 2011).

Die verminderte Expression von ACTB in Grad 3 MZT spiegelt die Ergebnisse einer anderen Proteinexpressionsanalyse wider. Hierbei wurden humane Osteosarkome mit benignen Knochentumoren verglichen und auch in diesem Fall zeigte die maligne Tumorgruppe die geringere ACTB-Expression (Li et al., 2010).

DISKUSSION

Keines der identifizierten Proteine wurde bereits im Zusammenhang mit kaninen kutanen Mastzelltumoren genannt und als relevant für deren Ausbreitung beschrieben. Ihr Expressionsprofil und ihre aus der Literatur bekannten Funktionen und Zusammenhänge mit anderen, vornehmlich humanen Tumorarten steigern jedoch ihren Wert als neue, potenzielle, prognostische Faktoren für die Früherkennung von metastatischem Potenzial von MZT. Selbstverständlich ist dafür die eindeutige Detektion mit Hilfe kostengünstigerer und routinemäßig im Einsatz befindlicher Analysemethoden wie Western Blot oder Immunhistologie nötig.

4.1.3 Mastzell-Differenzierungs-Proteine

Tryptasen zählen neben Hydrolasen und Proteasen zu den primären Mediatoren der Mastzellen, die bis zu ihrer Freisetzung in zytoplasmatischen Granula gespeichert werden (Schwartz et al., 1981).

In der vorliegenden Studie konnte Tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1) als statistisch signifikant differenziell exprimiertes Protein identifiziert werden, wobei Grad 3 MZT im Vergleich zu Grad 1 MZT eine verminderte Expression aufwiesen.

Dieser Verlust kann mit der fortschreitenden Entdifferenzierung und dem grundsätzlichen Verlust zytoplasmatischer Granula in höhergradigen MZT-Zellen im Einklang stehen, wie er auch in anderen Studien postuliert wurde (Simoes and Schoning, 1994; Webster et al., 2004). Somit erscheint die Verwendung dieses Proteins als prognostischer Marker zur Identifikation des Differenzierungsgrades von kaninen kutanen MZT durchaus sinnvoll.

Interessanterweise zeigten keine weiteren Mediatoren, wie Histamin oder Heparin, ein unterschiedliches Proteinexpressionsmuster im Vergleich der beiden Tumorgruppen.

4.2 Mutationsanalyse

Das Protoonkogen c-kit stand im Fokus des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit.

Auch wenn die bekannte Tandemduplikation im Exon 11 des Protoonkogens c-kit nur in einem geringen Prozentsatz aller Mastzelltumoren als ein Proliferationsstimulus angesehen werden kann, erscheint doch eine Untersuchung des Proteinexpressionsprofils von MZT mit oder ohne c-kit-Mutation sinnvoll. Zum einen könnten auch hierbei differenziell exprimierte Proteine als neue potenzielle therapeutische Ausgangspunkte identifiziert werden, zum anderen sollte die Analyse des Proteinexpressionsmusters von c-kit-mutierten MZT Rückschlüsse auf den Einfluss der Mutation auf das Proteom erlauben.

Zu diesem Zweck wurden sechs kanine kutane Mastzelltumoren (MZT) mit unterschiedlichem c-kit-Mutationsstatus untersucht. Drei Tumoren wiesen eine Tandemduplikation im Exon 11 auf, die anderen drei zeigten keine Mutation. Beide Gruppen setzten sich, entsprechend der aktuellen histologischen *Grading*-Systeme, aus jeweils 2 Grad 3 bzw. *high-grade* MZT und einem Grad 2 bzw. *low-grade* MZT zusammen (Kiupel et al., 2011; Patnaik et al., 1984). Unter Verwendung der gleichen Methoden (2D-DIGE und Massenspektrometrie) wie im ersten Abschnitt dieser Arbeit konnten schlussendlich 15 verschiedene Proteine mit statistisch signifikanten Expressionsunterschieden (*fold-change* > |1,5|; $p < 0,05$) zwischen beiden Tumorgruppen identifiziert werden. Unter ihnen fanden sich vor allem Zellmotilitäts-assoziierte Proteine, Proteine aus dem Lipidstoffwechsel sowie extrazelluläre Serumproteine.

4.2.1 Motilitäts-assoziierte Proteine

Drei Proteine, denen eine Beteiligung an der Zellmotilität zugeschrieben wird, konnten in der Mutationsanalyse identifiziert werden. Neben dem schon aus der Grad-Analyse bekannten *beta actin* (ACTB) waren dies das *actin-related protein 2* (ACTR2) und das *capping protein (actin filament) muscle Z-line* (CAPPA1).

Letzteres gehört zur Familie der *F-actin capping proteins* und ist so an der Wachstumsregulation der Aktinfilamente beteiligt. Eine Überexpression wurde im Zusammenhang mit oralen Plattenepithelkarzinomen, ovariellen Adenokarzinomen und invasiven Mammakarzinomen in der Humanmedizin beschrieben (Nomura et al., 2008; Partheen et al., 2008; Renz et al., 2008).

ACTR2 gehört ebenso wie ACTR3 zum ARP2/3-Komplex und ist somit über die Lamellipodien-Regulation essenziell für die Zellmotilität (Butler and Cooper, 2009). Erhöhte Proteinwerte wurden im Zusammenhang mit humanen invasiven Mamma-, Lungen- und kolorektalen Karzinomen beschrieben und sprechen erneut für eine Beteiligung des Proteinkomplexes an der Zellinvasion und Tumorzellmetastasierung (Yarar et al., 2002; Yokotsuka et al., 2011).

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für einen Einfluss der c-kit-Mutation auf die Zellmotilität von Mastzellen. Obwohl bislang keine Studie einen Grad-unabhängigen, signifikanten Unterschied im klinischen Verhalten, also der Metastasierungs- bzw. Rezidivrate, zwischen mutierten und nicht-mutierten MZT verifizieren konnte, scheinen die wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Tumorgruppen in der Expression von Motilitäts-assoziierten Proteinen zu liegen (Downing et al., 2002; Giantin et al., 2012; Zemke et al., 2002). Hingegen konnten Proliferations-assoziierte Proteine nicht in nennenswerter Anzahl identifiziert werden.

Eine Bestätigung der Ergebnisse könnte mittels Migrationsassay und *knock-down* der identifizierten Proteine in der c-kit-mutierten C2-Mastzelltumorzelllinie erfolgen.

4.2.2 Lipidmetabolismus

Arachidonate 15-lipoxygenase (ALOX15), *long chain fatty acid CoA-ligase 1* (ACSBG1) und Copine 1 (CPNE1) sind wichtige Proteine des Lipidstoffwechsels bzw. des Transports und der Ausschleusung membrangebundener Vesikel aus der Zelle.

ALOX15 und CPNE1 fanden sich in erhöhter Konzentration in den c-kit-mutierten MZT, während ACSBG1 in dieser Tumorgruppe vermindert exprimiert war.

ALOX15 ist an der Synthese und dem Metabolismus der Hydroxyperoxidase beteiligt und neuere Studien belegen eine Assoziation zwischen diesem Protein und einer verstärkten Tumorzellinvasion und Metastasierung in humanen Mammakarzinomen (Kerjaschki et al., 2011).

CPNE1 ist als Calcium-abhängiges Protein an molekularen Prozessen am Übergang zwischen Zytoplasma und Zellmembran beteiligt (Skawran et al., 2008).

Keines der genannten Proteine wurde bislang im Zusammenhang mit kaninen kutanen Mastzelltumoren beschrieben, doch ein unterschiedlicher Lipidstoffwechsel in den verschiedenen Tumorgruppen könnte eine mögliche Erklärung für die hier identifizierten, differenziell exprimierten Proteine sein.

4.2.3 Extrazelluläre Serumproteine

Fibrinogen (*gamma chain*, FGG), Apolipoprotein A1 (APOA1), Fetuin A (AHSG), Serumalbumin (ALB) und die Immunglobuline C und D (*gamma heavy chain C / D*, IGGC, IGGD) gehören zur Gruppe der extrazellulären Serumproteine. Sie werden im Allgemeinen in der Leber produziert und von dort in den peripheren Blutstrom abgegeben.

Alle der genannten Proteine zeigten in der vorliegenden Studie eine geringere Expression in den c-kit-mutierten MZT, im Vergleich zu den nicht-mutierten MZT.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte ein unterschiedlicher Gehalt an Tumorzellen und umgebendem stromalen Bindegewebe in den verschiedenen Tumorgruppen sein. Da nach erneuter histologischer Durchsicht aller Schnittpräparate ein solches Ungleichgewicht jedoch ausgeschlossen werden kann, rückt diese Hypothese in den Hintergrund.

Eine weitere Ursache könnte im unterschiedlichen klinischen Verhalten der MZT liegen. So könnten die nicht-mutierten MZT-Zellen, ähnlich wie normale Mastzellen, verstärkt vasoaktive Faktoren ausschütten und somit zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und einem nachfolgenden erhöhten Gehalt an Serumkomponenten im Tumorgewebe beitragen. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass die nicht-mutierten MZT-Zellen eine geringere Entdifferenzierung im Vergleich zu den mutierten Tumorzellen aufwiesen. Leider konnte diese Vermutung anhand des histologischen Bildes der einzelnen Tumoren nicht bestätigt werden.

Dritte mögliche Ursache könnte eine zufällige, verstärkte Degranulation der Tumorzellen dieser Tumorgruppe im Zuge der Manipulation bei der operativen Entfernung der MZT sein.

4.3 Schlussfolgerungen aus beiden Analysen

Sowohl der Vergleich von MZT unterschiedlichen histologischen Grades als auch mit unterschiedlichem c-kit-Mutationsstatus identifizierte differenziell exprimierte Proteine zwischen den jeweiligen Tumorguppen.

Bei der Grad-Analyse standen dabei Proteine im Vordergrund, die mit erhöhter Stress-Resistenz und Zellmotilität assoziiert sind sowie Mastzell-typische Differenzierungsproteine.

All diese Ergebnisse können mögliche Erklärungen für das klinisch aggressive Verhalten und den abnehmenden Differenzierungsgrad von Grad 3 MZT sein. Eine nachfolgende Validierung der Ergebnisse mit weiteren molekularbiologischen Methoden und größeren Fallzahlen ist selbstverständlich nötig. Doch sollten die Ergebnisse bestätigt werden können, stellen sie mögliche neue Anhaltspunkte für weitere Therapiestrategien dar.

Im Gegensatz zu diesen deutlichen Ergebnissen erbrachte die Mutationsanalyse überraschend wenige differenziell exprimierte Proteine mit Assoziation zu aggressivem Verhalten. Neben der Überexpression einiger Zellmotilitäts-assoziiierter Proteine standen ein vermehrter Gehalt an Lipidmetabolismus-assoziierten Proteinen und eine verringerte Konzentration von extrazellulären Serumproteinen in der Gruppe der c-kit-mutierten MZT im Vordergrund. Proliferations-assoziierte Proteine konnten darüber hinaus nicht in nennenswerter Anzahl identifiziert werden.

Diese relativ geringen Unterschiede mit Relevanz für das klinische Verhalten der MZT könnten die Hypothese unterstützen, dass die c-kit-Mutation alleine von geringerem Einfluss ist als der histologische Grad. Diese Aussage spiegelt sich auch im tatsächlich beobachteten, nicht unterscheidbaren klinischen Verhalten der Tumoren wider. Darüber hinaus steht diese Hypothese im Einklang mit der grundsätzlich geringen Inzidenz von Mutationen im Protoonkogen c-kit in der Gesamtheit der kaninen kutanen Mastzelltumoren.

Die insgesamt geringe Anzahl von differenziell exprimierten Proteinen in beiden Vergleichen könnte einerseits auf die verwendete Methode zurückgeführt werden, kann andererseits aber auch in der Heterogenität der Tumorzellpopulation begründet sein. So musste für eine signifikant unterschiedliche Expression eine relativ ähnliche Proteinregulation in allen Tumoren einer Gruppe nachweisbar sein.

Abschließend kann somit die erste Hypothese unterstützt werden, da Grad 1 und Grad 3 Mastzelltumoren deutliche Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsprofil aufweisen.

Die zweite Hypothese hingegen kann nicht gestützt werden, da die Tandemduplikation im Exon 11 des Protoonkogens c-kit offensichtlich nicht zu nennenswerten Veränderungen der Expression Proliferations-assoziiierter Proteine führt.

5 Zusammenfassung

Auswirkungen des histologischen Grades und des c-kit-Mutationsstatus auf das Proteinexpressionsprofil kaniner kutaner Mastzelltumoren

Patricia Schlieben

Die am häufigsten diagnostizierte Neoplasie der Haut des Hundes ist der kutane Mastzelltumor (MZT). Entsprechend seinem histologischen Zellbild und dem verwendeten *Grading*-System werden zwei bzw. drei unterschiedliche histologische Grade differenziert. Während Grad 1 bzw. *low-grade* MZT durch gut differenzierte monomorphe Tumorzellen charakterisiert sind und weder zur Metastasierung noch zur Rezidivbildung neigen, enthalten Grad 3 bzw. *high-grade* MZT entdifferenzierte, pleomorphe Mastzellen, die häufig metastasieren und rezidivieren.

Obwohl Mastzelltumoren, ähnlich wie Mammatumoren, seit längerer Zeit im Mittelpunkt der Forschung stehen, sind molekularbiologische Details, die zu diesem offensichtlichen unterschiedlichen klinischen Verhalten führen, weitgehend unbekannt.

Große Hoffnung wurde auf den Stammzelleffektor-Rezeptor KIT und sein Protoonkogen c-kit gelegt, dessen Aktivierung in normalen Mastzellen die Zellproliferation und -reifung sowie die Migration und Degranulation von Zellen steigert. Die Identifikation von aktivierenden Mutationen, wie etwa die Tandemduplikation im Exon 11, ließen dementsprechend einen großen Einfluss auf die Proliferation und Progression von kaninen Mastzelltumoren vermuten. Der direkte Einfluss der c-kit-Mutation auf das Proteinexpressionsprofil mutierter MZT-Zellen wurde bislang jedoch noch nicht analysiert. Darüber hinaus wurden bis heute nur bei circa 12 % aller MZT, bzw. 40 % der Grad 3 MZT entsprechende Mutationen identifiziert. Dies wiederum führt zu der Frage, welche anderen molekularbiologischen Veränderungen das aggressive klinische Verhalten der höhergradigen MZT verursachen.

In der vorliegenden Studie wurden deshalb die Proteinexpressionsmuster kaniner kutaner MZT mit unterschiedlichem histologischen Grad (je n=5) bzw. unterschiedlichem c-kit-Mutationsstatus (je n=3) mittels zweidimensionaler differenzieller Gelelektrophorese verglichen und differenziell exprimierte Proteine im Anschluss mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Tumoren mit unterschiedlichem histologischen Grad unterschieden sich in der Expression von 13 Proteinen. Dabei handelte es sich vorrangig um Stressproteine, mit Zellmotilität assoziierte Proteine und Mastzell-typische Differenzierungsproteine. Eine Validierung der Ergebnisse mit Hilfe weiterer biochemischer Methoden und größerer Fallzahlen wird im Weiteren zeigen, ob das aggressive klinische Verhalten höhergradiger MZT möglicherweise durch die veränderten Expressionsprofile dieser Proteine erklärbar sein könnte.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Mutationsanalyse, dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit, konnten 15 verschiedene, signifikant differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden. Entgegen der Arbeitshypothese fanden sich jedoch keine Proliferations-assoziierten Proteine im differenziellen Proteom. Diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass der Nachweis der c-kit-Mutation, im Gegensatz zum histologischen Grad, von geringer Relevanz für die Prognose des klinischen Verhaltens kaniner kutaner Mastzelltumoren ist.

6 Summary

Impact of Histological Grade and c-kit-Mutations on the Protein Expression Profile of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors

Patricia Schlieben

Cutaneous mast cell tumors (MCT) are one of the most common skin tumors in dogs. According to their histological appearance and the applied grading-system two or three different histological grades have to be distinguished. Grade 1 or low-grade MCT are characterized by well differentiated monomorphic tumor cells which neither tend to metastasize nor recur. Grade 3 or high-grade MCT are composed of dedifferentiated pleomorphic mast cells which often recur or even metastasize to distant organs.

Although mast cell tumors are in the focus of research worldwide molecular details which provide the basis for this different clinical behavior are in most aspects unknown.

Studies about KIT, the receptor for stem cell factor, and its proto-oncogene c-kit revealed promising results, as the identification of an activating internal tandem duplication in exon 11 lead to the assumption that KIT activity is of major relevance to MCT proliferation and progression. Impact of c-kit-mutations on the protein expression profile of mutated MCT cells is however unknown. Since recent studies identified c-kit-mutations in only 12 % of all MCT and 40 % of grade 3 MCT, other molecular alterations have to be responsible for the aggressive clinical behavior of grade 3 MCT.

Therefore, the present study compared the protein expression patterns of grade 1 and grade 3 MCT (each n=5) and of MCT with or without c-kit-mutation (each n=3) by two-dimensional difference gel electrophoresis. Differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry subsequently.

Tumors of distinct histological grade differed in the expression of 13 proteins. Most of them are associated with stress resistance, cell motility and mast cell differentiation. Further studies are needed now to evaluate if these modified expressions patterns are responsible for the aggressive clinical behavior of grade 3 MCT.

The comparison of c-kit-mutated and non-mutated MCT revealed 15 significantly differentially expressed proteins. Contrary to the second hypothesis no proteins with an association to increased proliferation activity were detectable. These results substantiate the assumption that activating mutations in the proto-oncogene c-kit are of less relevance for clinical behavior than the histological grade.

7 Referenzen

Abrahamsson, P.A., 1999. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer* 6, 503-519.

Arber, D.A., Tamayo, R., Weiss, L.M., 1998. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol* 29, 498-504.

Baker-Gabb, M., Hunt, G.B., France, M.P., 2003. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. *Aust Vet J* 81, 732-738.

Bartkowiak, K., Wieczorek, M., Buck, F., Harder, S., Moldenhauer, J., Effenberger, K.E., Pantel, K., Peter-Katalinic, J., Brandt, B.H., 2009. Two-dimensional differential gel electrophoresis of a cell line derived from a breast cancer micrometastasis revealed a stem/progenitor cell protein profile. *J Proteome Res* 8, 2004-2014.

Bollito, E., Berruti, A., Bellina, M., Mosca, A., Leonardo, E., Tarabuzzi, R., Cappia, S., Ari, M.M., Tampellini, M., Fontana, D., Gubetta, L., Angeli, A., Dogliotti, L., 2001. Relationship between neuroendocrine features and prognostic parameters in human prostate adenocarcinoma. *Ann Oncol* 12 Suppl 2, S159-164.

Bostock, D.E., 1973. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *The J Small Anim Pract* 14, 27-41.

Brodey, R.S., 1970. Canine and feline neoplasia. *Adv Vet Sci Comp Med* 14, 309-354.

Bryce, N.S., Clark, E.S., Leysath, J.L., Currie, J.D., Webb, D.J., Weaver, A.M., 2005. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol* 15, 1276-1285.

Burbulla, L.F., Schelling, C., Kato, H., Rapaport, D., Voitalla, D., Schiesling, C., Schulte, C., Sharma, M., Illig, T., Bauer, P., Jung, S., Nordheim, A., Schols, L., Riess, O., Kruger, R., 2010. Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. *Hum Mol Gen* 19, 4437-4452.

Butler, B., Cooper, J.A., 2009. Distinct roles for the actin nucleators Arp2/3 and hDia1 during NK-mediated cytotoxicity. *Curr Biol* 19, 1886-1896.

- Chetcuti, A., Margan, S.H., Russell, P., Mann, S., Millar, D.S., Clark, S.J., Rogers, J., Handelsman, D.J., Dong, Q., 2001. Loss of annexin II heavy and light chains in prostate cancer and its precursors. *Cancer Res* 61, 6331-6334.
- Columbo, M., Horowitz, E.M., Botana, L.M., MacGlashan, D.W., Jr., Bochner, B.S., Gillis, S., Zsebo, K.M., Galli, S.J., Lichtenstein, L.M., 1992. The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J Immunol* 149, 599-608.
- Conroy, J., 1983. Canine skin tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 19, 91-114.
- Cook, J.E., 1969. Canine mast cell diseases. *Natl Cancer Inst Monogr* 32, 267-283.
- Corazzari, M., Lovat, P.E., Armstrong, J.L., Fimia, G.M., Hill, D.S., Birch-Machin, M., Redfern, C.P., Piacentini, M., 2007. Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: the role of stress proteins ERdj5 and ERp57. *Br J Cancer* 96, 1062-1071.
- Croci, S., Recktenwald, C.V., Lichtenfels, R., Nicoletti, G., Dressler, S.P., De Giovanni, C., Astolfi, A., Palladini, A., Shin-ya, K., Landuzzi, L., Nanni, P., Lollini, P.L., Seliger, B., 2010. Proteomic and PROTEOMEX profiling of mammary cancer progression in a HER-2/neu oncogene-driven animal model system. *Proteomics* 10, 3835-3853.
- Davenport, E.L., Morgan, G.J., Davies, F.E., 2008. Untangling the unfolded protein response. *Cell Cycle* 7, 865-869.
- Derenzini, M., 2000. The AgNORs. *Micron* 31, 117-120.
- Derenzini, M., Pession, A., Trere, D., 1990. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* 63, 137-140.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L., 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 43, 240-246.
- Dobson, J.M., Scase, T.J., 2007. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *J Small Anim Pract* 48, 424-431.

REFERENZEN

- Dowling, P., Meleady, P., Dowd, A., Henry, M., Glynn, S., Clynes, M., 2007. Proteomic analysis of isolated membrane fractions from superinvasive cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1774, 93-101.
- Downing, S., Chien, M.B., Kass, P.H., Moore, P.E., London, C.A., 2002. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res* 63, 1718-1723.
- Ehrlich, P., 1878. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. In: *Collected Papers of Paul Ehrlich*. Archiv für Mikroskopische Anatomie, London, New York, 1956.
- Finnie, J.W., Bostock, D.E., 1979. Skin neoplasia in dogs. *Aust Vet J* 55, 602-604.
- Foster, C.S., Dodson, A.R., Ambrosine, L., Fisher, G., Moller, H., Clark, J., Attard, G., De-Bono, J., Scardino, P., Reuter, V.E., Cooper, C.S., Berney, D.M., Cuzick, J., 2009. Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement. *Br J Cancer* 101, 1137-1144.
- Fox, L.E., Rosenthal, R.C., Twedt, D.C., Dubielzig, R.R., MacEwen, E.G., Grauer, G.F., 1990. Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 4, 242-246.
- Fröberg, G.K., Lindberg, R., Ritter, M., Nordlind, K., 2009. Expression of serotonin and its 5-HT1A receptor in canine cutaneous mast cell tumours. *J Comp Pathol* 141, 89-97.
- Fukuhara, H., Kuramochi, M., Fukami, T., Kasahara, K., Furuhashi, M., Nobukuni, T., Maruyama, T., Isogai, K., Sekiya, T., Shuin, T., Kitamura, T., Reeves, R.H., Murakami, Y., 2002. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 93, 605-609.
- Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, J.H., Ashman, L.K., Kanayama, Y., et al., 1993. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 92, 1736-1744.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H., 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-1715.

- Giantin, M., Vascellari, M., Morello, E.M., Capello, K., Vercelli, A., Granato, A., Lopparelli, R.M., Nassuato, C., Carminato, A., Martano, M., Mutinelli, F., Dacasto, M., 2012. c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: correlations with post-surgical prognosis. *J Vet Diagn Invest* 24, 116-126.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., Gerstein, M., 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4, 117.
- Grills, C., Jithesh, P.V., Blayney, J., Zhang, S.D., Fennell, D.A., 2011. Gene expression meta-analysis identifies VDAC1 as a predictor of poor outcome in early stage non-small cell lung cancer. *PloS one* 6, e14635.
- Guo, H., Bai, Y., Xu, P., Hu, Z., Liu, L., Wang, F., Jin, G., Deng, Q., Tu, Y., Feng, M., Lu, D., Shen, H., Wu, T., 2010. Functional promoter -1271G>C variant of HSPB1 predicts lung cancer risk and survival. *J Clin Oncol* 28, 1928-1935.
- Hahn, K.A., Ogilvie, G., Rusk, T., Devauchelle, P., Leblanc, A., Legendre, A., Powers, B., Leventhal, P.S., Kinet, J.P., Palmerini, F., Dubreuil, P., Moussy, A., Hermine, O., 2008. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 22, 1301-1309.
- Hayes, M.J., Shao, D., Bailly, M., Moss, S.E., 2006. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J* 25, 1816-1826.
- Head, K.W., 1958. Cutaneous mast-cell tumours in the dog, cat and ox. *Br J Dermatol* 70, 399-408.
- Heller, G., Geradts, J., Ziegler, B., Newsham, I., Filipits, M., Markis-Ritzinger, E.M., Kandioler, D., Berger, W., Stiglbauer, W., Depisch, D., Pirker, R., Zielinski, C.C., Zochbauer-Muller, S., 2007. Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 103, 283-291.
- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C., 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5011-5015.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C., Chait, B.T., 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 63, 1193A-1203A.

REFERENZEN

Hottendorf, G.H., Nielsen, S.W., 1967. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. *Zentralbl Veterinarmed A* 14, 272-281.

Hottendorf, G.H., Nielsen, S.W., 1969. Canine mastocytoma-a review of clinical aspects. *J Am Vet Med Assoc* 154, 917-924.

Howard, E.B., Sawa, T.R., Nielsen, S.W., Kenyon, A.J., 1969. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. Gastric and duodenal ulcers in dogs with mastocytoma. *Pathol Vet* 6, 146-158.

Huang, Q., Ye, J., Chen, W., Wang, L., Lin, W., Lin, J., Lin, X., 2010. Heat shock protein 27 is over-expressed in tumor tissues and increased in sera of patients with gastric adenocarcinoma. *Clin Chem Lab Med* 48, 263-269.

Huntley, J.F., 1992. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. *J Comp Pathol* 107, 349-372.

Ito, A., Okada, M., Uchino, K., Wakayama, T., Koma, Y., Iseki, S., Tsubota, N., Okita, Y., Kitamura, Y., 2003. Expression of the TSLC1 adhesion molecule in pulmonary epithelium and its down-regulation in pulmonary adenocarcinoma other than bronchioloalveolar carcinoma. *Lab Invest* 83, 1175-1183.

Kaneda, A., Kaminishi, M., Sugimura, T., Ushijima, T., 2004. Decreased expression of the seven ARP2/3 complex genes in human gastric cancers. *Cancer Lett* 212, 203-210.

Kato, A., Kurita, S., Hayashi, A., Kaji, N., Ohashi, K., Mizuno, K., 2008. Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells. *Biochem J* 414, 261-270.

Kerjaschki, D., Bago-Horvath, Z., Rudas, M., Sexl, V., Schneckeleithner, C., Wolbank, S., Bartel, G., Krieger, S., Kalt, R., Hantusch, B., Keller, T., Nagy-Bojarszky, K., Huttary, N., Raab, I., Lackner, K., Krautgasser, K., Schachner, H., Kaserer, K., Rezar, S., Madlener, S., Vonach, C., Davidovits, A., Nosaka, H., Hammerle, M., Viola, K., Dolznig, H., Schreiber, M., Nader, A., Mikulits, W., Gnant, M., Hirakawa, S., Detmar, M., Alitalo, K., Nijman, S., Offner, F., Maier, T.J., Steinhilber, D., Krupitza, G., 2011. Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse. *J Clin Invest* 121, 2000-2012.

- Kim, D.H., Bae, J., Lee, J.W., Kim, S.Y., Kim, Y.H., Bae, J.Y., Yi, J.K., Yu, M.H., Noh, D.Y., Lee, C., 2009. Proteomic analysis of breast cancer tissue reveals upregulation of actin-remodeling proteins and its relevance to cancer invasiveness. *Proteomics Clin Appl* 3, 30-40.
- Kiupel, M., Webster, J.D., Bailey, K.L., Best, S., Delay, J., Detrisac, C.J., Fitzgerald, S.D., Gamble, D., Ginn, P.E., Goldschmidt, M.H., Hendrick, M.J., Howerth, E.W., Janovitz, E.B., Langohr, I., Lenz, S.D., Lipscomb, T.P., Miller, M.A., Misdorp, W., Moroff, S., Mullaney, T.P., Neyens, I., O'Toole, D., Ramos-Vara, J., Scase, T.J., Schulman, F.Y., Sledge, D., Smedley, R.C., Smith, K., P, W.S., Southorn, E., Stedman, N.L., Steficek, B.A., Stromberg, P.C., Valli, V.E., Weisbrode, S.E., Yager, J., Heller, J., Miller, R., 2011. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol* 48, 147-155.
- Klopfleisch, R., Meyer, A., Schlieben, P., Bondzio, A., Weise, C., Lenze, D., Hummel, M., Einspanier, R., Gruber, A.D., 2012. Transcriptome and proteome analysis of tyrosine kinase inhibitor treated canine mast cell tumour cells identifies potentially kit signaling-dependent genes. *BMC Vet Res* 8, 96.
- Klose, J., 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243.
- Klose, P., Weise, C., Bondzio, A., Multhaup, G., Einspanier, R., Gruber, A.D., Klopfleisch, R., 2011. Is there a malignant progression associated with a linear change in protein expression levels from normal canine mammary gland to metastatic mammary tumors? *J Proteome Res* 10, 4405-4415.
- Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobukuni, T., Kanbe, T., Maruyama, T., Ghosh, H.P., Pletcher, M., Isomura, M., Onizuka, M., Kitamura, T., Sekiya, T., Reeves, R.H., Murakami, Y., 2001. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27, 427-430.
- Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmerini, F., Leventhal, P.S., Guery, S., Moussy, A., Kinet, J.P., Hermine, O., Dubreuil, P., 2008. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res* 6, 1137-1145.
- Li, Y., Liang, Q., Wen, Y.Q., Chen, L.L., Wang, L.T., Liu, Y.L., Luo, C.Q., Liang, H.Z., Li, M.T., Li, Z., 2010. Comparative proteomics analysis of human osteosarcomas and benign tumor of bone. *Cancer Genet Cytogenet* 198, 97-106.

REFERENZEN

- Liao, A.T., Chien, M.B., Shenoy, N., Mendel, D.B., McMahon, G., Cherrington, J.M., London, C.A., 2002. Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 100, 585-593.
- London, C.A., 2009. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top Companion Anim Med* 24, 106-112.
- London, C.A., Galli, S.J., Yuuki, T., Hu, Z.Q., Helfand, S.C., Geissler, E.N., 1999. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol* 27, 689-697.
- London, C.A., Hannah, A.L., Zadovoskaya, R., Chien, M.B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M., Downing, S., Post, G., Boucher, J., Shenoy, N., Mendel, D.B., McMahon, G., Cherrington, J.M., 2003. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res* 9, 2755-2768.
- Luk, J.M., Lam, C.T., Siu, A.F., Lam, B.Y., Ng, I.O., Hu, M.Y., Che, C.M., Fan, S.T., 2006. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics* 6, 1049-1057.
- Ma, Y., Cunningham, M.E., Wang, X., Ghosh, I., Regan, L., Longley, B.J., 1999a. Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem* 274, 13399-13402.
- Ma, Y., Longley, B.J., Wang, X., Blount, J.L., Langley, K., Caughey, G.H., 1999b. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol* 112, 165-170.
- Macy, D.W., 1986. Canine and feline mast cell tumors: biologic behavior, diagnosis, and therapy. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1, 72-83.
- Madewell, B.R., 2001. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Intern Med* 15, 334-340.
- Mann, M., Hojrup, P., Roepstorff, P., 1993. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom* 22, 338-345.
- Mayer, M.N., 2006. Radiation therapy for canine mast cell tumors. *Can Vet J* 47, 263-265.

Snyder, P.W., 2012. Diseases of immunity. In: Pathologic basis of veterinary disease, McGavin, M.D., Zachary, J.F., Elsevier, St. Louis. 242-288.

Mederle, O., Mederle, N., Bocan, E.V., Ceausu, R., Raica, M., 2010. VEGF expression in dog mastocytoma. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 114, 185-188.

Meininger, C.J., Yano, H., Rottapel, R., Bernstein, A., Zsebo, K.M., Zetter, B.R., 1992. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 79, 958-963.

Miller, H.R., Huntley, J.F., Newlands, G.F., Irvine, J., 1990. Granule chymases and the characterization of mast cell phenotype and function in rat and mouse. *Monogr Allergy* 27, 1-30.

Misdorp, W., 2004. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Vet Q* 26, 156-169.

Mukaratirwa, S., 2005. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. *Vet Q* 27, 52-64.

Mullins, M.N., Dernell, W.S., Withrow, S.J., Ehrhart, E.J., Thamm, D.H., Lana, S.E., 2006. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). *J Am Vet Med Assoc* 228, 91-95.

Ni, M., Lee, A.S., 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 581, 3641-3651.

Nielsen, S.W., Cole, C.R., 1958. Canine mastocytoma; a report of one hundred cases. *Am J Vet Res* 19, 417-432.

Nomura, H., Uzawa, K., Ishigami, T., Kouzu, Y., Koike, H., Ogawara, K., Siiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., Kubosawa, H., Tanzawa, H., 2008. Clinical significance of gelsolin-like actin-capping protein expression in oral carcinogenesis: an immunohistochemical study of premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *BMC Cancer* 8, 39.

O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.

Owen, L.N., Brodey, R.S., Gillette, E.L., Milouchine, V.N., Misdorp, W., Parodi, A.-L., Syrkin, A.B., Theilen, G.H., 1980. WHO-TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. In: WHO-Classification, Geneva, pp. 14-15.

REFERENZEN

- Partheen, K., Levan, K., Osterberg, L., Claesson, I., Fallenius, G., Sundfeldt, K., Horvath, G., 2008. Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas. *Int J Cancer* 123, 2130-2137.
- Patnaik, A.K., Ehler, W.J., MacEwen, E.G., 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 21, 469-474.
- Pena-Alonso, E., Rodrigo, J.P., Parra, I.C., Pedrero, J.M., Meana, M.V., Nieto, C.S., Fresno, M.F., Morgan, R.O., Fernandez, M.P., 2008. Annexin A2 localizes to the basal epithelial layer and is down-regulated in dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 263, 89-98.
- Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F., Adnet, J.J., 1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 18, 5-14.
- Pressinotti, N.C., Klocker, H., Schafer, G., Luu, V.D., Ruschhaupt, M., Kuner, R., Steiner, E., Poustka, A., Bartsch, G., Sultmann, H., 2009. Differential expression of apoptotic genes PDIA3 and MAP3K5 distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. *Mol Cancer* 8, 130.
- Priester, W.A., 1973. Skin tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *J Natl Cancer Inst* 50, 457-466.
- Rabanal, R., Ferrer, L., 2002. Mast cell tumors: from the molecular biology to the clinic. In: *Proceedings of the ISVD Meeting, Nizza*, pp. 11-26.
- Rebuzzi, L., Willmann, M., Sonneck, K., Gleixner, K.V., Florian, S., Kondo, R., Mayerhofer, M., Vales, A., Gruze, A., Pickl, W.F., Thalhammer, J.G., Valent, P., 2007. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 320-333.
- Renz, M., Betz, B., Niederacher, D., Bender, H.G., Langowski, J., 2008. Invasive breast cancer cells exhibit increased mobility of the actin-binding protein CapG. *Int J Cancer* 122, 1476-1482.
- Rodrigo, J.P., Garcia-Pedrero, J.M., Llorente, J.L., Fresno, M.F., Allonca, E., Suarez, C., Hermsen, M., 2011. Down-regulation of annexin A1 and A2 protein expression in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Hum Pathol* 42, 88-94.

- Roskoski, R., Jr., 2005. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1307-1315.
- Rothwell, T.L., Howlett, C.R., Middleton, D.J., Griffiths, D.A., Duff, B.C., 1987. Skin neoplasms of dogs in Sydney. *Aust Vet J* 64, 161-164.
- Sakwe, A.M., Koumangoye, R., Guillory, B., Ochieng, J., 2011. Annexin A6 contributes to the invasiveness of breast carcinoma cells by influencing the organization and localization of functional focal adhesions. *Exp Cell Res* 317, 823-837.
- Scase, T.J., Edwards, D., Miller, J., Henley, W., Smith, K., Blunden, A., Murphy, S., 2006. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J Vet Intern Med* 20, 151-158.
- Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-322.
- Schulz, D.M., Bollner, C., Thomas, G., Atkinson, M., Esposito, I., Hofler, H., Aubele, M., 2009. Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry. *J Proteome Res* 8, 3430-3438.
- Schwartz, L.B., Lewis, R.A., Austen, K.F., 1981. Tryptase from human pulmonary mast cells. Purification and characterization. *J Biol Chem* 256, 11939-11943.
- Shchemelinin, I., Sevc, L., Necas, E., 2006. Protein kinase inhibitors. *Folia Biol (Praha)* 52, 137-148.
- Sherman, M., Multhoff, G., 2007. Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1113, 192-201.
- Shinkaruk, S., Bayle, M., Lain, G., Deleris, G., 2003. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3, 95-117.
- Siemeister, G., Martiny-Baron, G., Marme, D., 1998. The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Rev* 17, 241-248.
- Simoës, J.P., Schoning, P., 1994. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. *J Vet Diagn Invest* 6, 458-465.

REFERENZEN

- Skawran, B., Steinemann, D., Becker, T., Buurman, R., Flik, J., Wiese, B., Flemming, P., Kreipe, H., Schlegelberger, B., Wilkens, L., 2008. Loss of 13q is associated with genes involved in cell cycle and proliferation in dedifferentiated hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 21, 1479-1489.
- Taylor, F., Gear, R., Hoather, T., Dobson, J., 2009. Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases. *J Small Anim Pract* 50, 284-289.
- Taylor, F., Murphy, S., Hoather, T., Dobson, J., Scase, T., 2010. TSLC1 tumour-suppressor gene expression in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 8, 263-272.
- Thamm, D.H., Vail, D.M., 2007. Mast cell tumors. In: *Small animal clinical oncology*, Withrow, S.J., Vail, D.M., Saunders Elsevier, St Louis. 402-424.
- Treere, D., Pession, A., Montanaro, L., Chieco, P., Derenzini, M., 1997. AgNOR protein expression and tumor growth rate of human carcinoma xenografts growing subcutaneously in nude mice. *Eur J Histochem* 41 Suppl 2, 153-154.
- Tsai, M., Takeishi, T., Thompson, H., Langley, K.E., Zsebo, K.M., Metcalfe, D.D., Geissler, E.N., Galli, S.J., 1991. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6382-6386.
- Unlu, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett, D.E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1997. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88, 243-251.
- Waisman, D.M., 1995. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 149-150, 301-322.
- Walls, A.F., Jones, D.B., Williams, J.H., Church, M.K., Holgate, S.T., 1990. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol* 162, 119-126.
- Wang, J.W., Peng, S.Y., Li, J.T., Wang, Y., Zhang, Z.P., Cheng, Y., Cheng, D.Q., Weng, W.H., Wu, X.S., Fei, X.Z., Quan, Z.W., Li, J.Y., Li, S.G., Liu, Y.B., 2009. Identification of metastasis-associated proteins involved in gallbladder carcinoma metastasis by proteomic

analysis and functional exploration of chloride intracellular channel 1. *Cancer Lett* 281, 71-81.

Webster, J.D., Kiupel, M., Kaneene, J.B., Miller, R., Yuzbasiyan-Gurkan, V., 2004. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 41, 371-377.

Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R.A., Kaneene, J.B., Kiupel, M., 2007. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol* 44, 298-308.

Weinkauff, M., Zimmermann, Y., Hartmann, E., Rosenwald, A., Rieken, M., Pastore, A., Hutter, G., Hiddemann, W., Dreyling, M., 2009. 2-D PAGE-based comparison of proteasome inhibitor bortezomib in sensitive and resistant mantle cell lymphoma. *Electrophoresis* 30, 974-986.

Welle, M.M., Bley, C.R., Howard, J., Rufenacht, S., 2008. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol* 19, 321-339.

Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F., 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnol (N Y)* 14, 61-65.

Yang, F., Tran, T.A., Carlson, J.A., Hsi, E.D., Ross, C.W., Arber, D.A., 2000. Paraffin section immunophenotype of cutaneous and extracutaneous mast cell disease: comparison to other hematopoietic neoplasms. *Am J Surg Pathol* 24, 703-709.

Yarar, D., D'Alessio, J.A., Jeng, R.L., Welch, M.D., 2002. Motility determinants in WASP family proteins. *Mol Biol Cell* 13, 4045-4059.

Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., Ullrich, A., 1987. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6, 3341-3351.

Yee, N.S., Paek, I., Besmer, P., 1994. Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *J Exp Med* 179, 1777-1787.

REFERENZEN

Yokotsuka, M., Iwaya, K., Saito, T., Pandiella, A., Tsuboi, R., Kohno, N., Matsubara, O., Mukai, K., 2011. Overexpression of HER2 signaling to WAVE2-Arp2/3 complex activates MMP-independent migration in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 126, 311-318.

Zanini, C., Pulera, F., Carta, F., Giribaldi, G., Mandili, G., Maule, M.M., Forni, M., Turrini, F., 2008. Proteomic identification of heat shock protein 27 as a differentiation and prognostic marker in neuroblastoma but not in Ewing's sarcoma. *Virchows Arch* 452, 157-167.

Zemke, D., Yamini, B., Yuzbasiyan-Gurkan, V., 2002. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol* 39, 529-535.

Zhi, H., Zhang, J., Hu, G., Lu, J., Wang, X., Zhou, C., Wu, M., Liu, Z., 2003. The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 106, 327-333.

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

“Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumors”

P. Schlieben, A. Meyer, C. Weise, A. Bondzio, R. Einspanier, AD Gruber, R. Klopffleisch

The Veterinary Journal 2012 Nov; 194(2):210-4. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.04.002.

Epub 2012 May 10. PMID: 22578690

“Tandem Duplication of KIT Exon 11 Influences the Proteome of Canine Mast Cell Tumours”

P. Schlieben, A. Meyer, C. Weise, A. Bondzio, AD Gruber, R. Klopffleisch

Journal of Comparative Pathology 2013 May; 148(4):318-22. doi:10.1016/j.jcpa.2012.07.006.

Epub 2012 Aug 27. PMID: 22935087

“Worin unterscheiden sich canine Mastzelltumoren verschiedener Grade?”

P. Schlieben, A. Meyer, C. Weise, A. Bondzio, R. Einspanier, A.D. Gruber, R. Klopffleisch

7. Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin (13.07.2012)

Programm & Abstracts, Mensch und Buch Verlag Berlin, ISBN 978-3-86387-153-6, S. 64

„Globale Proteinexpressionsanalysen kaniner kutaner Mastzelltumoren“

P. Schlieben, A. Meyer, C. Weise, A. Bondzio, A.D. Gruber, R. Klopffleisch

56. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, Deutschland (09.-10.03.2013)

9 Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Robert Klopffleisch und Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber dafür danken, dass ich die hier vorliegende Arbeit mit ihrer Unterstützung anfertigen durfte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Dahlem Research School danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Afonso da Costa danke ich für das *handling* des Acrylamids und die Unterstützung im Labor.

Besonderer Dank gilt Angelika Bondzio und Christoph Weise für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft in allerlei biochemischen Angelegenheiten. Monika Schärig und Petra Schulze möchte ich ebenfalls für ihre technische Unterstützung im Labor danken.

Anja Meyer danke ich sowieso.

Bei den Kollegen im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und das fröhliche Arbeitsklima bedanken.

Meiner persönlichen Lektorin Franka danke ich von ganzem Herzen.

Emma & Rainer danke ich jeden Tag dafür, dass sie für mich da sind und mich zum Lachen bringen.

Meinen Eltern und meinem Bruder mit samt seiner Familie danke ich für ihre bedingungslose Liebe.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 11.02.2013

Patricia Schlieben