

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

**und**

**Laboklin GmbH & Co. KG  
Bad Kissingen**

**Histologische, immunhistologische und molekulargenetische  
Charakterisierung von kaninen digitalen Melanomen  
und Mastzelltumoren**

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

**vorgelegt von  
David Conrad  
Tierarzt aus Gießen**

**Berlin 2023  
Journal-Nr.: 4427**







Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und  
Laboklin GmbH & Co. KG  
Bad Kissingen

**Histologische, immunhistologische und molekulargenetische Charakterisierung  
von kaninen digitalen Melanomen und Mastzelltumoren**

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

vorgelegt von  
David Conrad  
Tierarzt aus Gießen

Berlin 2023  
Journal-Nr.: 4427

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch  
Zweite Gutachterin: PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach  
Dritte Gutachterin: PD Dr. Kerstin Müller

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

dogs, cutaneous melanoma, digits, tumour cells, mast cells, mutation, histology,  
histopathology, immunohistology, molecular genetics techniques

Tag der Promotion: 09.11.2023

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: 978-3-96729-231-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2023**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

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 2023 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Angefertigt bei Laboklin GmbH & Co. KG

Steubenstraße 4

97688 Bad Kissingen





# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1 Digitale Melanome des Hundes .....	3
2.1.1 Prognose, Rasseprädispositionen und Häufigkeit.....	3
2.1.2 Klinisches Erscheinungsbild .....	4
2.1.3 Diagnostik .....	4
2.1.3.1 Röntgen .....	4
2.1.3.2 Histologie.....	4
2.2 Molekulargenetische Aspekte von Melanomen des Hundes .....	6
2.2.1 Der MAPK-Signalweg .....	6
2.2.2 BRAF .....	6
2.2.3 KRAS und NRAS .....	7
2.2.4 c-KIT .....	8
2.2.5 Copy number variation (CNV) von KITLG .....	8
2.3 Therapie von Melanomen des Hundes .....	9
2.4 Digitale Mastzelltumoren des Hundes .....	9
2.4.1 Prognose, Rasseprädispositionen und Häufigkeit.....	9
2.4.2 Klinisches Erscheinungsbild .....	11
2.4.3 Diagnostik .....	11
2.4.3.1 Zytologie .....	11
2.4.3.2 Histologie und Graduierungssysteme.....	12
2.4.3.3 Immunhistologie .....	12
2.5 Molekulargenetische Aspekte von Mastzelltumoren des Hundes (c-KIT).....	13
2.6 Therapie von Mastzelltumoren des Hundes .....	14

<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen</b> .....	17
3.1	Fragestellungen und Ziele der durchgeführten Untersuchungen.....	17
3.2	Zusammenstellung der eigenen Publikationen.....	18
3.2.1	Studie 1: Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs .....	19
3.2.2	Studie 2: Immunohistochemical and Molecular Genetic Analysis of Canine Digital Mast Cell Tumours.....	37
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	57
4.1	Untersuchungsgut, Auswertungsmethoden und Limitationen.....	57
4.2	Molekulargenetische Charakteristika von kaninen digitalen Melanomen .....	60
4.3	Histologische, immunhistologische und molekulargenetische Eigenschaften von kaninen digitalen Mastzelltumoren.....	63
4.4	Abschließende Bewertung der molekulargenetischen Studien an kaninen digitalen Melanomen und Mastzelltumoren.....	67
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	71
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	73
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	75
<b>8</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	95
8.1	Erstautorenschaft.....	95
8.2	Ko-Autorenschaft .....	95
8.3	Poster.....	95
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	96
<b>10</b>	<b>Finanzierungsquellen</b> .....	97
<b>11</b>	<b>Erklärung zu Interessenskonflikten</b> .....	98
<b>12</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	99

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Überblick über digitale Melanome des Hundes in der Literatur .....	5
Tab. 2: Überblick über digitale Mastzelltumoren des Hundes in der Literatur.....	11
Tab. 3: Ergänzendes Material: Case description, clinical and histomorphological findings of dogs with digital melanoma (n = 86) .....	34
Tab. 4: Ergänzendes Material: Mutational analysis, histological and immunohistochemical findings and case description of dogs with digital mast cell tumours (n = 68).....	53



## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ARAF	Isoform A des Rat Fibrosarcoma
BRAF	Isoform B des Rat Fibrosarcoma
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CNV	copy number variation
CRAF	Isoform C des Rat Fibrosarcoma
ddPCR	droplet digital Polymerase-Kettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	und andere
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
G	Guanin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	high power field
HRAS	Harvey Ras
ITD	Interne Tandemduplikation
KITLG	KIT-Ligand
KRAS	Kirsten Ras
MAPK	microtubule-associated protein kinase
MEK	MAP kinase/ERK kinase
mm	Millimeter
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	Stichprobenumfang
NRAS	Neuroblastoma Ras
p	Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RAF	Rat Fibrosarcoma

RAS	Rat Sarcoma
SCF	stem cell factor
SNP	single nucleotide polymorphism
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer

# 1 Einleitung

Melanome und Mastzelltumoren sind nach den Plattenepithelkarzinomen die häufigsten neoplastischen Erkrankungen an der Zehe des Hundes. Durch ihre Lokalisation stellt sich die chirurgische Resektion generell schwierig dar, da das vollständige Entfernen des Tumors mit infiltratfreien Wundrändern häufig nicht durchführbar ist. Daher ist meistens eine Amputation der betroffenen Zehe notwendig. Wird die Zehe nicht frühzeitig amputiert, sind die Risiken eines Rezidivs und einer Metastasierung hoch.

Die molekulare Onkologie versucht, die Entstehung von Tumoren auf genetischer Ebene zu entschlüsseln und darauf basierend Therapien zu entwickeln. In der Humanmedizin werden immer neue Gene identifiziert, die in ihrer mutierten Form auf zellulärer Ebene in die Signalkaskaden eingreifen und die Entstehung von Tumoren begünstigen können. Im Sinne der vergleichenden Pathologie wird zunehmend versucht, dieses Forschungsgebiet auch in der Tiermedizin voranzutreiben.

Bei den Melanomen ist bekannt, dass sie sich je nach Lokalisation biologisch sehr unterschiedlich verhalten können. Melanome der Maulhöhle beispielsweise sind hoch aggressiv und metastasieren häufig, während die kutanen Formen eine bessere Prognose haben. Kanine digitale Melanome nehmen prognostisch eine Zwischenstellung zwischen den oralen und kutanen Formen ein. Gene wie *BRAF*, *RAS* und *c-KIT* sind im humanen Melanom und dem oralen Melanom des Hundes vergleichsweise gut untersucht. *Copy number variations* (CNV) von *KITLG* könnten als Keimbahnmutation im Melanom des Hundes eine Rolle spielen. Für Melanome der Zehe des Hundes lagen bisher jedoch nur unzureichende Daten vor. Ziel der ersten Studie war es daher, die Melanome der Zehe des Hundes mit Blick auf mögliche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zum humanen Melanom und dem kaninen oralen Melanom molekulargenetisch zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei auf dem Nachweis von *BRAF*-, *NRAS*-, *KRAS*- und *c-KIT*-Mutationen. Die somatischen Mutationen sollten außerdem auf ihre prognostische Relevanz untersucht werden. Des Weiteren wurde das Vorhandensein der CNV des *KITLG*-Gens als Keimbahnmutation untersucht, um eine potenzielle genetische Prädisposition erkennen zu können.

Auch im kaninen Mastzelltumor als häufigstem Hauttumor des Hundes gelten bestimmte Lokalisationen, wie mukokutane Übergänge, und einzelne Rassen, wie der Shar-Pei, als Faktoren, die mit dem Auftreten von bösartigen Varianten assoziiert sind. Während subkutane Mastzelltumoren in der Mehrheit benigne sind, werden kutane Mastzelltumoren histologisch graduiert und eine Einschätzung der Prognose daraus abgeleitet. Immunhistologische Verfahren, wie der Nachweis des Expressionsmusters der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT und des Proliferationsmarkers Ki-67, können dabei ebenso von

prognostischer Bedeutung sein. Im Mastzelltumor des Hundes wurde *c-KIT* bereits als ein für die Tumorentstehung relevantes Gen identifiziert. Interne Tandemduplikationen (ITD) in Exon 11 sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert, während ITD in Exon 8 prognostisch günstig zu sein scheinen. Mutationen in den Exons 9 und 14 sind zwar selten, spielen aber eine Rolle in der Entwicklung von Resistenzen gegenüber therapeutisch eingesetzten Kinaseinhibitoren. Die zweite Studie hatte das Ziel, die Dignität von kaninen Mastzelltumoren der Zehe bewerten zu können. Dafür wurden eine histologische Graduierung vorgenommen und immunhistologische Verfahren angewendet. Ferner sollte ein Überblick über relevante *c-KIT*-Mutationen in dieser kaum untersuchten anatomischen Lokalisation erstellt werden. Die verschiedenen in der Studienkohorte vertretenen Rassen wurden außerdem auf eine Neigung zur Ausbildung von digitalen Mastzelltumoren bestimmter Dignitäten untersucht.



## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Digitale Melanome des Hundes**

#### 2.1.1 Prognose, Rasseprädispositionen und Häufigkeit

Melanome des Hundes finden sich in der Maulhöhle, der Haut, den Augen und an der Zehe (Nishiya et al. 2016). Während die kutanen und okulären Formen meist gutartige Varianten darstellen (Nishiya et al. 2016), sind die Melanome der Maulhöhle sehr häufig maligne (Goldschmidt und Goldschmidt 2017; Nishiya et al. 2016; Bostock 1979).

Innerhalb der malignen Tumoren der Zehe ist das Melanom mit Anteilen zwischen 16 % bis 32 % nach dem Plattenepithelkarzinom die zweithäufigste Tumorentität (Grassinger et al. 2021; Wobeser et al. 2007; Henry et al. 2005; Marino et al. 1995). Tabelle 1 fasst die Studien zusammen, die sich bereits mit Melanomen der Zehe des Hundes beschäftigt haben. Digitale Melanome nehmen prognostisch eine Stellung zwischen den oralen und kutanen Melanomen ein (Prouteau und Andre 2019) – für diese Form sind Metastasierungsraten zwischen 50 % und 58 % beschrieben (Wobeser et al. 2007; Henry et al. 2005; Marino et al. 1995). In der Literatur berichtete Überlebensraten für digitale Melanome des Hundes liegen bei 42 % bis 44 % für 1 Jahr und bei 11 % bis 13 % für 2 Jahre (Henry et al. 2005; Marino et al. 1995). Unabhängig von ihrer Lokalisation metastasieren Melanome häufig über das lymphatische System in die Lunge (Goldschmidt und Goldschmidt 2017).

Das Alter der von digitalen Melanomen betroffenen Hunde variiert zwischen 2 und 16 Jahren mit einem Median von 10 Jahren (Grassinger et al. 2021; Wobeser et al. 2007; Henry et al. 2005). Hinsichtlich der Geschlechterverteilung beim Auftreten von Melanomen an der Zehe liegen widersprüchliche Angaben vor. Es sind sowohl weibliche Tiere (Wobeser et al. 2007), als auch männliche Tiere (Grassinger et al. 2021) in der Überzahl beschrieben worden.

Zu den Hunderassen, die häufig vom Melanom der Zehe betroffen sind, zählen Beauceron (Gillard et al. 2014), Golden Retriever (Manley et al. 2011; Schultheiss 2006; Smith et al. 2002), Irish Setter (Henry et al. 2005; Smith et al. 2002), Labrador Retriever (Grassinger et al. 2021; Manley et al. 2011; Schultheiss 2006), Rottweiler (Grassinger et al. 2021; Goldschmidt und Goldschmidt 2017; Gillard et al. 2014; Manley et al. 2011; Schultheiss 2006), Schnauzer (Grassinger et al. 2021; Goldschmidt und Goldschmidt 2017; Gillard et al. 2014; Henry et al. 2005) und Scottish Terrier (Goldschmidt und Goldschmidt 2017; Manley et al. 2011).

### 2.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Melanome der Zehe zeigen im Anschnitt oft eine braun-schwarze Farbe, sind aber makroskopisch nur selten von anderen Tumoren, wie dem Plattenepithelkarzinom, abgrenzbar. Sie können, bedingt durch das vom Krallenbett ausgehende Wachstum, anfänglich auch unentdeckt bleiben (Goldschmidt und Goldschmidt 2017).

### 2.1.3 Diagnostik

#### 2.1.3.1 Röntgen

Melanome der Zehe neigen zu knocheninvasivem Wachstum mit Osteolyse, auch wenn diese seltener beobachtet wird als beim Plattenepithelkarzinom der Zehe (Marino et al. 1995). Demnach ist eine Differenzierung von anderen Neoplasien oder Frakturen mittels Bildgebung nicht möglich und eine histologische Diagnose unverzichtbar.

#### 2.1.3.2 Histologie

Histologisch sind im Melanom häufig ein epitheloider oder spindeliger Zelltyp sowie Mischformen aus den beiden genannten Typen zu beobachten (Goldschmidt und Goldschmidt 2017; Spangler und Kass 2006). Die Zellen besitzen prominente Kernkörperchen und intrazytoplasmatische Melanineinlagerungen, die teilweise auch von Melanophagen aufgenommen werden (Goldschmidt und Goldschmidt 2017; Hewicker-Trautwein et al. 2012). Der Pigmentierungsgrad variiert von starker bis hin zu fehlender Pigmentierung (amelanotisches Melanom). Im Falle einer hochgradigen Pigmentierung ist meist ein Bleichen des Präparates notwendig, um anschließend Kriterien wie Zellmorphologie oder Mitosezahl beurteilen zu können (Hewicker-Trautwein et al. 2012). Bei geringgradig pigmentierten bis amelanotischen Melanomen kann ein immunhistologischer Nachweis der Proteine Melan-A und S-100 innerhalb der Tumorzellen bei der Diagnosefindung hilfreich sein (Hewicker-Trautwein et al. 2012). Eine Studie von Spangler und Kass (2006) untersuchte verschiedene histologische Kriterien in kaninen melanozytären Tumoren auf ihre prognostische Aussagekraft. Die Studienkohorte enthielt neben oralen (19 %) und kutanen (59 %) melanozytären Tumoren auch eine Gruppe (19 %), die melanozytäre Tumoren an der Innenseite der Lefze (von der Schleimhaut ausgehend) sowie an der Pfote zusammenfasste. Für diese Gruppe galten die Mitosezahl und das Vorhandensein von Zellkernatypien als prognostisch bedeutsam. Zu den anderen untersuchten Kriterien zählten außerdem der Zelltyp, Zellkerndurchmesser und die An- oder Abwesenheit verschiedener Faktoren, wie beispielweise intraläsionale Entzündungen und Nekrosen.

Tab. 1: Überblick über digitale Melanome des Hundes in der Literatur

<b>Autoren</b>	<b>Tiere/Fälle mit Melanomen der Zehe</b>	<b>Fokus</b>
Bostock 1979	12	134 Fälle mit Melanomen aus unterschiedlichen Lokalisationen. Analyse der Überlebenszeiten.
Marino et al. 1995	24	117 Fälle mit pathologischen Befunden der Zehe. Analyse der Prävalenz der verschiedenen Befunde und Überlebenszeitanalyse.
Henry et al. 2005	10	64 Fälle mit Tumoren der Zehe. Analyse der klinischen Charakteristika und der Überlebenszeiten.
Schultheiss 2006	27	278 Fälle mit Melanomen aus unterschiedlichen Lokalisationen. Analyse des Einflusses der histologischen Kriterien auf den klinischen Verlauf.
Spangler und Kass 2006	Kutanes Gewebe an der Zehe (n = 2), Ballen (n = 7), Krallenbett (n = 9)	384 Fälle mit Melanomen oder Melanozytomen. Evaluierung der histologischen und epidemiologischen Kriterien als Basis für die Prognose.
Wobeser et al. 2007	52	404 Fälle mit pathologischen Befunden der Zehe. Analyse der Prävalenz der verschiedenen Befunde und Überlebenszeitanalyse.
Manley et al. 2011	58	58 Fälle mit digitalen Melanomen. Retrospektive Evaluierung der Anwendung einer DNA-Vakzine.
Chu et al. 2013*	3	49 Fälle mit Melanomen aus unterschiedlichen Lokalisationen. Molekulargenetische Detektion von Mutationen in <i>c-KIT</i> Exon 11. In den 3 digitalen Melanomen wurden keine <i>c-KIT</i> -Mutationen gefunden.
Gillard et al. 2014	1.652 Melanome, davon 6 % digital und 4 % unguale	2.350 Fälle mit melanozytären Tumoren. 1.652 der Fälle waren Melanome. Anwendung von klinischen und histopathologischen Analysen. Zusätzlich molekulargenetische Analysen (allerdings wurden digitale/unguale Fälle nicht molekulargenetisch analysiert).
Hendricks et al. 2018*	3	37 Fälle mit Melanomen, die genomisch analysiert wurden. Mutationen, die in den 3 akralen Melanomen detektiert wurden: <i>NRAS</i> (1 Mutation), <i>KRAS</i> (2 Mutationen).
Grassinger et al. 2021	196	2.912 Fälle mit pathologischen Befunden der Zehe. Analyse der Rasseprädispositionen.

\* Studien, die digitale Melanome molekulargenetisch untersucht haben

## 2.2 Molekulargenetische Aspekte von Melanomen des Hundes

### 2.2.1 Der MAPK-Signalweg

Der MAPK (*microtubule-associated protein kinase*)-Signalweg ist ein von Rezeptor-Tyrosinkinase ausgehender Signalweg, der auf zellulärer Ebene Wachstum und Proliferation aktiviert und reguliert (Wagener und Müller 2010; Dhillon et al. 2007). Durch Bindung mit einem entsprechenden Liganden wird die Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert und überführt durch zwischengeschaltete Adapterproteine das Ras-Protein in seine aktivierte Form (Wagener und Müller 2010; Dhillon et al. 2007). Das Ras-Protein aktiviert zusammen mit einer Src-Kinase das B-Raf-Protein, welches nun im phosphorylierten Zustand vorliegt und seinerseits MEK 1 und 2 (MAP kinase/ERK kinase) aktiviert (Wagener und Müller 2010; Dhillon et al. 2007; Downward 2003). MEK 1/2 aktivieren wiederum ERK 1 und 2 (*extracellular signal-regulated kinase*), welche über Phosphorylierung eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren aktivieren (Wagener und Müller 2010; Dhillon et al. 2007; Downward 2003).

### 2.2.2 BRAF

Genprodukte der *RAF*-Familie (*ARAF*, *BRAF* und *CRAF*; letzteres auch als *RAF1* bezeichnet) sind Serin/Threonin-Kinasen innerhalb des MAPK-Signalwegs und sind den Ras-Proteinen nachgeschaltet (Zaman et al. 2019). Innerhalb der drei *RAF*-Isoformen ist *BRAF* jene, die am häufigsten in menschlichen Neoplasien im mutierten Zustand gefunden wurde (Mochizuki et al. 2015; Dhillon et al. 2007). In ca. 90 % der Fälle handelt es sich dabei um die *BRAF* V600E-Variante – eine Mutation, bei der es zu einem Austausch von Thymin durch Adenin innerhalb des Exons 15 auf Chromosom 7 kommt und zu einer daraus folgenden Substitution von Valin durch Glutaminsäure am Codon 600 (Mochizuki et al. 2015; Dhillon et al. 2007). Diese Variante ist in ca. 60 % aller humanen Melanome detektierbar (Goel et al. 2006; Tsao et al. 2004; Brose et al. 2002; Davies et al. 2002). BRAF-Inhibitoren werden bei Vorhandensein dieser Mutation im humanen Melanom therapeutisch eingesetzt (Domingues et al. 2018). Das Gegenstück zur humanen *BRAF* V600E-Variante ist die kanine V595E-Variante, welche durch den gleichen Basentausch in Exon 15 auf Chromosom 16 charakterisiert ist (Mochizuki und Breen 2015). Einer Übersichtsarbeit nach wurde die *BRAF* V595E-Variante vor allem in Übergangszell- und Prostatakarzinomen des Hundes gefunden – in anderen kaninen Tumoren, einschließlich dem Melanom, ist sie eine Seltenheit (Mochizuki und Breen 2015). Die Entstehung von *BRAF*-Mutationen kann beim Menschen bereits in den gutartigen Vorstufen der Melanome beobachtet werden und wird möglicherweise durch ultraviolette Strahlung induziert (Wagener und Müller 2010). Dies bietet eine Erklärung dafür, dass *BRAF*-Mutationen selten bis gar nicht im oralen Melanom

des Menschen auftreten (Wong et al. 2019; Lyu et al. 2018; Wong et al. 2005) und auch im Melanom des Hundes keine bedeutende Rolle spielen (Wong et al. 2019; Hendricks et al. 2018; Mochizuki et al. 2015; Gillard et al. 2014; Shelly et al. 2005). Kanine mukosale Melanome der Maulhöhle erfahren keinen Einfluss durch ultraviolette Strahlung, und auch die kaninen kutanen Melanome sind durch das Fellkleid von ihr größtenteils abgeschirmt. Hunde stellen damit ein Forschungsmodell für die Untersuchung von humanen Melanomen dar, die unabhängig von *BRAF*-Mutationen und ohne den Einfluss von ultravioletter Strahlung entstehen (Mochizuki und Breen 2015).

### 2.2.3 KRAS und NRAS

*KRAS* und *NRAS* sind, genau wie *HRAS*, Gene, die für die Familie der Ras-Proteine kodieren, welche innerhalb der MAPK-Signaltransduktion den Raf-Proteinen vorgeschaltet sind und über Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert werden (Wagener und Müller 2010; Dhillon et al. 2007). In einer Übersichtsarbeit wurde beschrieben, dass *RAS*-Mutationen in durchschnittlich jedem fünften Tumor des Menschen zu finden sind, wobei *KRAS* mit ca. 85 % bei weitem am häufigsten mutiert war, gefolgt von *NRAS* (ca. 15 %) und *HRAS* (weniger als 1 %) (Downward 2003). Als mutierte *Hotspot*-Loci, also Genabschnitte, die besonders häufig von Mutationen betroffen sind, wurden die Codone 12, 13 und 61 identifiziert (Bos 1989). Laut einer weiteren Übersichtsarbeit finden sich in humanen Melanomen 10 – 15 % *NRAS*-Mutationen (ca. 80 % im Codon 61), während *KRAS* (ca. 77 % im Codon 12) in 2 % der Fälle mutiert ist (Cicenas et al. 2017). Im humanen akralen Melanom konnte in 27,9 % der Fälle eine Mutation in *NRAS* in den häufig betroffenen Codonen 12, 13 und 61 identifiziert werden (Yeh et al. 2019). In Hunden fanden sich *NRAS*-Mutationen in 48 % der Tiere, die an einer myeloischen Leukämie erkrankt waren und *KRAS*-Mutationen in 80 % aller kaninen Pankreaskarzinome (Mochizuki und Breen 2017). Auch kanine Melanome wurden in verschiedenen Studien bereits auf *RAS*-Mutationen untersucht. *NRAS*-Mutationen wurden in 2 von 16 Hunden mit kutanem Melanom gefunden (Mayr et al. 2003). Eine andere Studie fand weder *KRAS*- noch *NRAS*-Mutationen in 11 Melanomen, wobei die Tumorlokalisation nicht angegeben wurde (Escobar et al. 2004). Eine weitere Studie untersuchte insgesamt 31 mukosale, 2 kutane und 1 uveales Melanom des Hundes sowie 3 Melanome der Zehe (Hendricks et al. 2018). Dabei fanden sich in den mukosalen Melanomen 2 *NRAS*- und jeweils 1 *KRAS*- bzw. *HRAS*-Mutation. Die beiden kutanen Melanome enthielten jeweils 1 *KRAS*- bzw. *NRAS*-Mutation. In allen 3 Zehenmelanomen ließen sich zudem *RAS*-Mutationen nachweisen (2 *KRAS*, 1 *NRAS*). Die Studie von Hendricks et al. (2018) war vor Beginn der vorliegenden Arbeit die einzige, die sich mit *RAS*-Mutationen im kaninen Melanom der Zehe befasst hatte. Da in ihr nur 3 Melanome der Zehe enthalten waren, ist ihre Aussagekraft diesbezüglich begrenzt.

#### 2.2.4 c-KIT

Das *c-KIT*-Gen ist ein Proto-Onkogen, das für die membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase KIT kodiert, welche den *stem cell factor* (SCF) als Liganden besitzt (Wagener und Müller 2010). Rezeptor und Ligand spielen u. a. eine Rolle in der Hämatopoese und der Entwicklung von Melanozyten (Smedley et al. 2021; Wagener und Müller 2010) und besitzen eine initiale Steuerungsfunktion im MAPK-Signalweg (Pham et al. 2020). In einer Übersichtsarbeit wurden bei 80 % aller gastrointestinalen Stromatumoren des Menschen *c-KIT*-Mutationen identifiziert, wobei die Exons 8, 9, 11 und 17 als *Hotspot*-Regionen genannt werden (Babaei et al. 2016). Im humanen Melanom wurden *c-KIT*-Mutationen häufig in Exon 11 gefunden – in geringerem Umfang aber auch in den Exons 13, 17 und 18 (Beadling et al. 2008).

Verschiedene Studien haben *c-KIT* im Melanom des Hundes untersucht und dabei keine Mutationen gefunden (Brocca et al. 2020; Wong et al. 2019; Gillard et al. 2014; Murakami et al. 2011). Eine Studie konnte jedoch eine Mutationsrate für *c-KIT* von 30 % innerhalb von kaninen oralen Melanomen sowie 8 % innerhalb gut differenzierter kaniner oraler melanozytärer Neoplasien feststellen, wobei sich insgesamt 9 nicht-synonyme Mutationen fanden, die allesamt nicht das Exon 11 betrafen (Smedley et al. 2021). Smedley et al. (2021) sequenzierten dafür alle Exons von *c-KIT*. Eine weitere Studie fand 5 synonyme Mutationen in *c-KIT* Exon 11 bei insgesamt 49 Hunden mit Melanomen – diese Studie war auch die einzige, die digitale Melanome (n = 3) untersuchte, in denen sie allerdings keine *c-KIT*-Mutationen fand (Chu et al. 2013).

#### 2.2.5 Copy number variation (CNV) von KITLG

*KITLG* kodiert als Gen für den *stem cell factor* (SCF) und damit für den Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT (Yang et al. 2018). Variationen der Kopienanzahl, sogenannte *copy number variations* (CNV), von *KITLG* spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Melanozyten und sind u. a. verantwortlich für die unterschiedlichen Ausprägungen der Fellfarben des Hundes (Bannasch et al. 2021). CNV von *KITLG* werden außerdem mit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Zehe in Verbindung gebracht (Karyadi et al. 2013). Eine aktuelle Studie konnte bei schwarzen Riesenschnauzern sogar einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer erhöhten CNV von *KITLG* und dem Risiko der Entstehung von digitalen Plattenepithelkarzinomen identifizieren (Aupperle-Lellbach et al. 2023). Als Keimbahnmutationen sind CNV von *KITLG* beim Hund ein mögliches Ziel zur züchterischen Beeinflussung der Entstehung von Melanomen und Tumoren generell. Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit waren Melanome des Hundes noch nicht auf Variationen der Kopienanzahl von *KITLG* untersucht worden.

## 2.3 Therapie von Melanomen des Hundes

Mittel der ersten Wahl zur Therapie von kaninen digitalen Melanomen ist die chirurgische Exzision des Tumors, was aufgrund der anatomischen Lage häufig eine Amputation der Zehe bedeutet (Nishiya et al. 2016).

Eine Strahlentherapie kann gerade im Frühstadium der Tumorprogression die therapeutischen Erfolgsaussichten verbessern, wohingegen eine Chemotherapie in den meisten Fällen nicht zu einer signifikant verlängerten Überlebenszeit beiträgt (Nishiya et al. 2016).

Der Einsatz von BRAF-Inhibitoren ist ein Bestandteil der Therapie im humanen kutanen Melanom, da *BRAF*-Mutationen hier häufig vorkommen (Savoia et al. 2019). Ebenso sind Punktmutationen in den *RAS*-Genen relevante Onkogene in humanen Neoplasien (Bos 1989), wobei vor allem *NRAS*-Mutationen im humanen kutanen Melanom allgemein, aber auch im humanen akralen Melanom gefunden worden sind (Yeh et al. 2019; Cicenias et al. 2017). Duale MEK/RAF-Inhibitoren können bei diesen *RAS*-Mutationen eingesetzt werden (Savoia et al. 2019).

Untersuchungen an humanen und kaninen Melanomen und Melanom-Zelllinien zeigten, dass beide Spezies eine Aktivierung des MAPK- und des PI3K/AKT-Signalweges im Melanom aufwiesen, obwohl sich die Mechanismen dieser Aktivierung in Mensch und Hund voneinander unterscheiden (Fowles et al. 2015). Eine synergistische Hemmung beider Signalwege durch MAPK- bzw. PI3K/AKT-Inhibitoren konnte in beiden Spezies eine reduzierte Überlebensfähigkeit der melanozytären Tumorzellen erzielen, was diese Strategie zu einer möglichen therapeutischen Option für kanine Melanome werden lässt (Fowles et al. 2015). Weitere Untersuchungen folgten, die den therapeutischen Nutzen einer MEK- und PI3K/mTOR-Inhibition (Wei et al. 2016) und einer dualen MEK- und mTORC1/2-Inhibition (Wei et al. 2020) in kaninen mukosalen Melanom-Zelllinien aufzeigten.

## 2.4 Digitale Mastzelltumoren des Hundes

### 2.4.1 Prognose, Rasseprädispositionen und Häufigkeit

Kutane Mastzelltumoren stellen mit 10 – 21 % einen bedeutenden Anteil an den neoplastischen Hauterkrankungen des Hundes (Tamlin et al. 2020). In einer retrospektiven Studie an 70.966 kaninen Neoplasien aus histopathologischem Diagnosematerial waren kutane Mastzelltumoren nach den Mammatumoren und den gutartigen epithelialen Hauttumoren die insgesamt dritthäufigste Tumorart (Aupperle-Lellbach et al. 2022). Neoplastische Prozesse an der Zehe sind in bis zu 10,5 % der Fälle auf einen Mastzelltumor zurückzuführen (Grassinger et al. 2021; Wobeser et al. 2007; Marino et al. 1995).

Einige Rassen werden in der Literatur als prädisponiert für die Entstehung von Mastzelltumoren angeführt. Zu den am häufigsten aufgeführten Rassen zählen unter anderem Boxer (Aupperle-Lellbach et al. 2022; Pierini et al. 2019; Śmiech et al. 2019; Warland und Dobson 2013), Golden und Labrador Retriever (Aupperle-Lellbach et al. 2022; Śmiech et al. 2019; Warland und Dobson 2013), Französische Bulldoggen (Aupperle-Lellbach et al. 2022; Śmiech et al. 2019) und Staffordshire Bullterrier (Warland und Dobson 2013). Die Rasse kann außerdem ein Faktor sein, der einen Einfluss auf die Dignität von Mastzelltumoren hat. So zeigt der Shar-Pei mehrheitlich schlecht differenzierte Mastzelltumoren (Aupperle-Lellbach et al. 2022; Śmiech et al. 2019), während der Mops zur Ausbildung von gut differenzierten Formen neigt (Aupperle-Lellbach et al. 2022; McNiel et al. 2006). Eine retrospektive Studie der Laboklin GmbH & Co. KG konnte Boxer und Retriever als prädisponiert für die Entstehung von Mastzelltumoren der Zehe identifizieren (Grassinger et al. 2021).

Das durchschnittliche Alter von Hunden, die an Mastzelltumoren erkranken, liegt bei 9 Jahren (Blackwood et al. 2012), wobei männliche und weibliche Tiere gleich häufig betroffen sind (Śmiech et al. 2019; Blackwood et al. 2012). Die Daten aus zwei Studien mit digitalen Mastzelltumoren, in denen das Alter und die Geschlechterverteilung der Hunde angegeben wurden, kamen zu vergleichbaren Ergebnissen (Grassinger et al. 2021; Wobeser et al. 2007).

Die Dignität von kutanen Mastzelltumoren lässt sich nicht pauschal angeben, da sich die Tumoren klinisch sehr unterschiedlich verhalten können (Welle et al. 2008). Von bestimmten anatomischen Lokalisationen, wie der Leistengegend oder mukokutanen Übergängen, ist bekannt, dass Mastzelltumoren an diesen Stellen häufig schlechtere Prognosen besitzen, was auch mit der lokalisationsbedingten schlechteren Resezierbarkeit zusammenhängen könnte (Blackwood et al. 2012). Per Histologie kann über Graduierungssysteme eine Einschätzung der Dignität des kutanen Mastzelltumors getroffen werden. Die beiden etablierten Systeme wurden von Patnaik et al. (1984) und Kiupel et al. (2011) entwickelt. Sie sind jedoch nicht bei subkutanen Mastzelltumoren anwendbar, welche insgesamt eine bessere Prognose besitzen (Bellamy und Berlato 2022). Mastzelltumoren der Zehe des Hundes waren bis zur Entstehung der vorliegenden Arbeit noch nicht in größerem Umfang mittels der beiden genannten Graduierungssysteme analysiert worden. Andere Studien, die sich mit digitalen Mastzelltumoren des Hundes beschäftigt haben, sind in Tabelle 2 aufgeführt.



Tab. 2: Überblick über digitale Mastzelltumoren des Hundes in der Literatur

<b>Autoren</b>	<b>Tiere/Fälle mit Mastzelltumoren der Zehe</b>	<b>Fokus</b>
Marino et al. 1995	8	117 Fälle mit pathologischen Befunden der Zehe. Analyse der Prävalenz der verschiedenen Befunde und Überlebenszeitanalyse.
Wobeser et al. 2007	20	404 Fälle mit pathologischen Befunden der Zehe. Analyse der Prävalenz der verschiedenen Befunde und Überlebenszeitanalyse.
Grassinger et al. 2021	52	2.912 Fälle mit pathologischen Befunden der Zehe. Analyse der Rasseprädispositionen.
Gasser 2022	1	Bericht über die erfolgreiche lokale Behandlung eines digitalen subkutanen Mastzelltumors eines Hundes mit Tigilanoltiglat.

#### 2.4.2 Klinisches Erscheinungsbild

Kutane Mastzelltumoren präsentieren sich makroskopisch sehr uneinheitlich. Sie können als Knoten, haarlose Tumoren oder auch diffuse Schwellungen auftreten und außerdem ulzerieren (Kiupel 2017). Durch den Inhalt ihrer Granula (vor allem Histamin und Heparin) können bei mechanischer Reizung des Tumors Hautrötungen (sogenannte Darier-Zeichen) und über die Stimulation von H<sub>2</sub>-Rezeptoren gastrointestinale Ulzera auftreten (Kiupel 2017).

#### 2.4.3 Diagnostik

##### 2.4.3.1 Zytologie

Die zytologische Beurteilung von Feinnadelaspiraten ist eine geeignete Möglichkeit der initialen Diagnosestellung, mit der über 90 % der Mastzelltumoren erkannt werden können (Baker-Gabb et al. 2003). Zytologische Graduierungskriterien sind hierfür bereits entwickelt worden (Camus et al. 2016). Mastzellen sind zytologisch an ihren charakteristischen intrazytoplasmatischen Granula erkennbar, die sich beispielsweise mit Toluidinblau- oder Wright-Giemsa-Färbungen darstellen lassen (Blackwood et al. 2012). Auch wenn ein pleomorphes Zellbild in der Zytologie einen Hinweis auf die schlechte Differenzierung eines Mastzelltumors geben kann, sollte für die exakte Beurteilung der Differenzierung eine histologische Graduierung erfolgen (Blackwood et al. 2012).

#### 2.4.3.2 Histologie und Graduierungssysteme

Es existieren im Wesentlichen zwei histologische Graduierungssysteme, die zur prognostischen Beurteilung von kaninen kutanen Mastzelltumoren herangezogen werden. Das erste System unterteilt die Mastzelltumoren in drei verschiedene Grade (Grad I – III), wobei Grad I gut differenzierte, Grad II intermediäre und Grad III schlecht differenzierte Tumoren darstellen (Patnaik et al. 1984). Zur Gradeinteilung werden die Lokalisation des Tumors in der Haut, Zell- und Kernmorphologie, Gewebsarchitektur, Mitosen und die Ausprägung von Ödemen und Nekrosen analysiert. Eine Schwachstelle dieses Systems ist, dass der Großteil der Mastzelltumoren anhand dieser Kriterien dem intermediären Grad II zugeordnet wird, welcher eine unzureichende prognostische Aussagekraft besitzt (Kiupel et al. 2011). Dem Patnaik-System wird außerdem ein hohes Maß an Subjektivität vorgeworfen, was dazu führt, dass die Graduierung von ein und demselben Tumor bei verschiedenen Pathologinnen und Pathologen voneinander abweichen kann (Northrup et al. 2005). Das zweite System unterteilt die Mastzelltumoren nur noch in gut und schlecht differenziert beziehungsweise in *low-grade* und *high-grade* (Kiupel et al. 2011). Dafür werden Mitosen, mehrkernige Zellen, Zellen mit bizarren Kernen und Karyomegalie als Beurteilungskriterien verwendet. Das Kiupel-System besitzt eine höhere prognostische Signifikanz und wird in der Routinediagnostik häufig zusätzlich zum Patnaik-System angewendet (Avallone et al. 2021).

#### 2.4.3.3 Immunhistologie

Die beiden immunhistologischen Marker KIT und Ki-67 werden in der Mastzelltumordiagnostik häufig angewendet und haben prognostische Relevanz (Freytag et al. 2021). Die Rezeptor-Tyrosinkinase KIT lässt sich mittels entsprechender immunhistologischer Verfahren detektieren. Eine Besonderheit der Mastzelltumoren ist, dass diese neben dem membranassoziierten Expressionsmuster (Muster 1) auch ein aberrantes, fokal zytoplasmatisches (Muster 2) oder ein aberrantes, diffus zytoplasmatisches Muster (Muster 3) zeigen können (Kiupel et al. 2004). Bislang konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, wie diese aberranten immunhistologischen Expressionsmuster in neoplastischen Mastzellen zustande kommen. Es ist jedoch bekannt, dass die aberranten Expressionsmuster 2 und 3 des KIT-Rezeptors mit einem höheren histologischen Grad und damit auch mit einer schlechteren Differenzierung und Prognose des Mastzelltumors korrelieren (Kiupel et al. 2004).

Das Ki-67-Antigen ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein, dessen Expression eng an den Zellzyklus gekoppelt ist – im Sinne einer Expression in mitotisch aktiven Zellen. Es ist jedoch nicht in Zellen vorhanden, die sich in der Ruhephase der Zellteilung befinden (Scholzen und Gerdes 2000). Durch diese Eigenschaften und die Möglichkeit, das Ki-67-Antigen immunhistologisch darstellen zu können, ist es ein gut geeigneter Marker für die

Proliferationsaktivität von Tumoren (Scholzen und Gerdes 2000). Die erhöhte Expression des Ki-67-Antigens ist in Mastzelltumoren außerdem mit einem höheren histologischen Grad assoziiert (Webster et al. 2007). Als Grenzwert sind 23 Ki-67-positive Zellen in einer 1 cm<sup>2</sup> großen *ocular grid area* bei 400-facher Vergrößerung für kutane Mastzelltumoren beschrieben (Webster et al. 2007).

## 2.5 Molekulargenetische Aspekte von Mastzelltumoren des Hundes (c-KIT)

Die humane Mastozytose lässt sich in eine kutane und eine systemische Form unterteilen, wobei die kutane Form häufig im Kindesalter auftritt und gutartig verläuft, während die systemische Form je nach Ausprägung schwerwiegende Verläufe annehmen kann (Tamlin et al. 2020). Mutationen im *c-KIT*-Gen spielen bei der systemischen Form eine Rolle und sind besonders häufig in Exon 17 lokalisiert, wo sie Resistenzen gegenüber dem Kinaseinhibitor Imatinib verursachen können (Lim et al. 2009; Garcia-Montero et al. 2006; Frost et al. 2002).

In feline Mastzelltumoren werden Mutationen im *c-KIT*-Gen in ca. 70 % der Fälle gefunden, wobei diese am häufigsten in den Exons 8 und 9 lokalisiert sind (Sabattini et al. 2017; Isotani et al. 2010). Das Vorhandensein einer *c-KIT*-Mutation korreliert allerdings nicht mit der Differenzierung des Tumors, der mitotischen Aktivität oder dem Überleben der Katzen (Sabattini et al. 2017) und besitzt demnach keine prognostische Aussagekraft.

Die *c-KIT*-Mutationen sind im kutanen Mastzelltumor des Hundes bereits umfangreich erforscht worden. Mutationen in diesem Gen finden sich in kutanen Mastzelltumoren am häufigsten in Exon 11 und weniger häufig in den Exons 8 und 9 (Tamlin et al. 2020). In bis zu 50 % der Fälle wurden ITD innerhalb von *c-KIT* Exon 11 gefunden, die mit einem höheren histologischen Grad, erhöhter Ki67-Antigen-vermittelter zellulärer Proliferationsaktivität, aberranten KIT-Expressionsmustern, erhöhtem Metastasierungsrisiko und verringerter Überlebenszeit assoziiert waren (Tamlin et al. 2022; Brocks et al. 2021; Mochizuki et al. 2017; Webster et al. 2007; Webster et al. 2006). Die seltenen Mutationen in Exon 9 von *c-KIT* scheinen in kutanen Mastzelltumoren an der Entstehung von Resistenzen gegenüber dem Kinaseinhibitor Masitinib beteiligt zu sein (Gentilini et al. 2020) und sind damit hinsichtlich einer möglichen Therapie als ungünstig zu bewerten. Ähnlich verhält es sich bei der sehr selten detektierten Mutation in Exon 14, für die ein Fall beschrieben ist, bei dem eine sekundäre Mutation dieser Art bei einem Mastzelltumor *in vitro* eine Resistenz gegenüber dem Kinaseinhibitor Imatinib verursachte (Nakano et al. 2017). Auf der anderen Seite wurden in einer aktuelleren Studie die im Vergleich zu ITD in *c-KIT* Exon 11 weniger häufigen ITD in *c-KIT* Exon 8 als geeignete genetische Marker für weniger aggressive kutane Mastzelltumoren diskutiert (Brocks et al. 2021). In der Studie von Brocks et al. (2021) zeigten

die Tiere, die eine solche Mutation aufwiesen, unter anderem längere Überlebenszeiten und histologisch eher gut differenzierte Mastzelltumoren.

## **2.6 Therapie von Mastzelltumoren des Hundes**

Die chirurgische Exzision ist bei Mastzelltumoren die Therapie der Wahl (Blackwood et al. 2012). Mastzelltumoren, die dem Patnaik Grad III entsprechen, sollten mit einem lateralen Rand von mindestens 3 cm und einer Faszien­schicht in der Tiefe reseziert werden (Blackwood et al. 2012). Im Falle der Patnaik Grad I- und II-Tumoren, die eine Größe von 4 cm nicht überschreiten, kann bereits ein lateraler Exzisionsrand von 2 cm und eine Faszien­schicht in der Tiefe genügen, ohne dass die Risiken der inkompletten Resektion oder des lokalen Rezidivs dadurch ansteigen würden (Selmic und Ruple 2020). In bestimmten anatomischen Lokalisation, wozu insbesondere auch die Zehe zählt, ist die Einhaltung des Abstandes zum tumorfreien Gewebe nur schwer oder gar nicht umsetzbar (Blackwood et al. 2012), was häufig in einer Amputation der kompletten Zehe resultiert. An kaninen Mastzelltumoren der Zehe kann durch die präoperative Anwendung von Prednisolon eine makroskopische Verringerung der Tumorgröße erreicht werden, was die komplette Resektion des Tumors erleichtern kann (Stancliff und Gilson 2008). Für den Einsatz des Kinaseinhibitors Masitinib als Primärtherapie sind ebenfalls partielle Tumorremissionen beschrieben (Horta et al. 2018a). Ist die Resektion eines Mastzelltumors aufgrund der anatomischen Lage nicht vollständig möglich, kann zusätzlich zur chirurgischen Intervention eine postoperative Bestrahlung erfolgen (Dobson und Scase 2007). Auch die neoadjuvante Anwendung von Chemotherapeutika ist in diesem Zusammenhang beschrieben worden (Nardi et al. 2022).

Masitinib (Masivet®), Toceranib (Palladia®) und Imatinib (Glivec®) gehören zu den niedermolekularen Kinaseinhibitoren, die die mutationsbedingte Autophosphorylierung von Tyrosinkinase­n intrazellulär hemmen können (London 2009). Das Vorliegen einer *c-KIT*-Mutation kann das Ansprechen des Mastzelltumors auf eine Therapie mit diesen Inhibitoren begünstigen (London et al. 2009; Hahn et al. 2008). Der Einsatz von Masitinib ist nach den Zulassungskriterien der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) dementsprechend nur dann indiziert, wenn im Vorfeld in dem Tumor eine *c-KIT*-Mutation nachgewiesen wurde. Untersuchungen an kaninen Mastzelltumor-Zelllinien, die eine ITD in dem für den juxtamembränen Teil von KIT kodierenden Genabschnitt aufwiesen, haben gezeigt, dass Masitinib zwar über die Inhibition von KIT in der Lage ist, die Mastzellproliferation zu hemmen, es wurde dabei aber auch beobachtet, dass im weiteren Verlauf verschiedene andere pro-proliferative Signalwege aktiviert wurden (Klopfleisch et al. 2012). Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass in einigen Fällen eine parallele Inhibierung von mehreren Signalkaskaden sinnvoll ist (Klopfleisch et al. 2012). Toceranib kann auch ohne

nachgewiesene *c-KIT*-Mutation eingesetzt werden, da der Mutationsnachweis als Grundlage für den therapeutischen Einsatz dieses Wirkstoffes nicht in der EMA-Zulassung genannt wird. In einer klinischen Studie zeigten 10 von 21 Hunden mit Mastzelltumoren ein Ansprechen auf eine Therapie mit Imatinib, wobei das Vorliegen einer Mutation in *c-KIT* Exon 11 keinen prädiktiven Wert hatte, da auch die Hunde ein vergleichbares Ansprechen auf die Therapie zeigten, die frei von dieser Mutation waren (Isotani et al. 2008). Es ist allerdings anzumerken, dass eine Therapie mit dem Wirkstoff Imatinib möglicherweise hepatotoxisch wirken kann, mit hohen Kosten verbunden ist (London 2009) und keine EMA-Zulassung für die Kleintiermedizin besitzt.

Tigilanoltiglat ist ein pflanzlicher Wirkstoff, der über die Aktivierung der Proteinkinase C bei intratumoraler Applikation eine Tumorregression bewirken kann (Boyle et al. 2014). Der Wirkstoff wurde von der EMA unter dem Handelsnamen Stelfonta® zugelassen und eignet sich, den Zulassungskriterien nach, zur Behandlung von nicht resezierbaren und nicht metastasierten kaninen Mastzelltumoren. Für die kutanen Formen wird keine lokalisationsbezogene Einschränkung formuliert. Für subkutane Mastzelltumoren wird in der Zulassung formuliert, dass diese für die Therapie mit Tigilanoltiglat am Ellenbogen oder Sprunggelenk bzw. distal davon lokalisiert sein müssen. Ein Fallbericht beschreibt die Anwendung von Tigilanoltiglat an einem subkutanen Mastzelltumor an der Zehe eines Hundes (Gasser 2022). Die Diagnose wurde mittels Feinnadelaspiration und einer mikroskopischen Untersuchung gestellt – weitere histologische oder immunhistologische Befunde wurden nicht erhoben. Durch eine einmalige intratumorale Injektion von Tigilanoltiglat konnte eine komplette Remission des Tumors ohne Rezidiv erreicht und eine Zehenamputation somit umgangen werden (Gasser 2022).



### 3 Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Fragestellungen und Ziele der durchgeführten Untersuchungen

Mithilfe molekulargenetischer Untersuchungen können Mutationen in Genen, die an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind, detektiert werden. Die molekulargenetischen Ergebnisse haben zum Teil prognostische und therapeutische Relevanz. Die humanmedizinische Forschung schreitet diesbezüglich stetig voran und auch für kanine Melanome und Mastzelltumoren wurden bereits entsprechende Mutationen identifiziert. Die Daten beziehen sich dabei zum Großteil auf Tumoren in häufig betroffenen anatomischen Lokalisationen. Die Zehe als Tumorlokalisierung war in diesen Studien insgesamt unterrepräsentiert und kaum untersucht. Die vorliegende Arbeit fokussierte sich daher auf die molekulargenetische Charakterisierung von Melanomen und Mastzelltumoren an der Zehe des Hundes. Histologie und Immunhistologie waren weitere Methoden, mit denen diese Tumoren charakterisiert wurden.

In Studie 1 wurden anhand von 86 kaninen Melanomen der Zehe folgende Fragestellungen behandelt:

- Entsprechen die somatischen Mutationen in digitalen Melanomen des Hundes denen, die für das humane kutane Melanom beschrieben sind (*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *c-KIT*)?
- Unterscheiden sich digitale Melanome des Hundes in ihren somatischen Mutationen von den akralen Melanomen des Menschen?
- Unterscheiden sich digitale Melanome des Hundes hinsichtlich der detektierten somatischen Mutationen von den hochmalignen kaninen oralen Melanomen?
- Haben somatische Mutationen in digitalen Melanomen des Hundes eine prognostische Relevanz?
- Spielen *copy number variations* von *KITLG* als mögliche Keimbahnmutation im digitalen Melanom des Hundes eine Rolle?

Die Untersuchung von 68 kaninen digitalen Mastzelltumoren behandelte in Studie 2 folgende Fragestellungen:

- Wie ist die Verteilung der histologischen Grade in Mastzelltumoren der Zehe des Hundes?
- Wie stellt sich das immunhistologische Expressionsmuster der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT und die Zählung der Ki-67-Antigen-positiven Zellen im digitalen Mastzelltumor des Hundes dar, und lässt sich daraus eine prognostische Relevanz ableiten?
- Wie häufig sind Mutationen in den *c-KIT* Exons 8, 9, 11 und 14 in kaninen digitalen Mastzelltumoren nachweisbar, und stehen diese in einer Beziehung zu den histologischen und immunhistologischen Parametern?

- Manche Hunderassen sind prädisponiert für die Entstehung von Mastzelltumoren generell, sowie für das Auftreten von Mastzelltumoren bestimmter Dignität. Gelten diese Verhältnisse auch im Mastzelltumor an der Zehe des Hundes?

### **3.2 Zusammenstellung der eigenen Publikationen**

Eigenanteilbeschreibung:

Ich war an der Planung beider Studien beteiligt und habe das Probenmaterial ausgewählt sowie histologisch ausgewertet. Ich habe per Mikrotomschnitt das Material für die molekulargenetischen Untersuchungen in beiden Studien gewonnen und DNA aus dem Material isoliert.

In Studie 2 habe ich Gewebeschnitte für die Immunhistologie angefertigt, mit der isolierten DNA eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt und die Sequenzierungsdaten ausgewertet.

Im Anschluss habe ich die Publikationen verfasst.

Herr Prof. Dr. Robert Klopffleisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin war fachlicher Begleiter beider Studien und war an den Anfertigungen der Publikationen beteiligt.

Frau PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach von der Laboklin GmbH & Co. KG war beteiligt an der Planung und Auswertung beider Studien sowie an der Anfertigung der Publikationen und hat beide Studien fachlich begleitet.

Frau PD Dr. Katja Steiger, Frau Nicole Pfarr und Herr Thomas Metzler vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München haben einen Teil der Proben aus Studie 1 genetisch analysiert und die Daten ausgewertet.

Frau Alexandra Kehl von der Laboklin GmbH & Co. KG hat den zweiten Teil der Proben aus Studie 1 genetisch untersucht und die Daten ausgewertet. Des Weiteren hat sie die genetischen Untersuchungen in Studie 2 koordiniert und war Ansprechpartnerin bezüglich der Datenauswertung.

Herr Dr. Christoph Beitzinger von der Laboklin GmbH & Co. KG war Ansprechpartner für die Auswertung der Daten zu den Fellfarben in Studie 1.

Herr Dr. Konrad Fischer vom Lehrstuhl für Tierbiotechnologie der TUM School of Life Sciences Weihenstephan hat an der Methodenentwicklung in Studie 1 mitgewirkt.

Herr Dr. Tobias Müller vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg war an der statistischen Auswertung von Studie 2 beteiligt.



### 3.2.1 Studie 1: Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs




Conrad D., Kehl A., Beitzinger C., Metzler T., Steiger K., Pfarr N., Fischer K., Klopffleisch R., Aupperle-Lellbach H. (2022): Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs. Vet Sci 9 (2), 56.

<https://doi.org/10.3390/vetsci9020056>

License: CC BY 4.0

## Article

# Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs

David Conrad <sup>1,\*</sup>, Alexandra Kehl <sup>2</sup> , Christoph Beitzinger <sup>2</sup>, Thomas Metzler <sup>3</sup>, Katja Steiger <sup>3</sup> , Nicole Pfarr <sup>3</sup> , Konrad Fischer <sup>4</sup>, Robert Klopffleisch <sup>5</sup> and Heike Aupperle-Lellbach <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology, LABOKLIN GmbH & Co. KG, 97688 Bad Kissingen, Germany; aupperle@laboklin.com

<sup>2</sup> Department of Molecular Biology, LABOKLIN GmbH & Co. KG, 97688 Bad Kissingen, Germany; kehl@laboklin.com (A.K.); beitzinger@laboklin.com (C.B.)

<sup>3</sup> Institute of Pathology, School of Medicine, Technische Universität München, 81675 München, Germany; thomas.metzler@tum.de (T.M.); katja.steiger@tum.de (K.S.); nicole.pfarr@tum.de (N.P.)

<sup>4</sup> School of Life Sciences Weihenstephan, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany; konrad.fischer@tum.de

<sup>5</sup> Department of Pathology, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany; Robert.Klopffleisch@fu-berlin.de

\* Correspondence: conrad@laboklin.com

**Abstract:** Canine digital melanoma, in contrast to canine oral melanoma, is still largely unexplored at the molecular genetic level. The aim of this study was to detect mutant genes in digital melanoma. Paraffin-embedded samples from 86 canine digital melanomas were examined for the *BRAF* V595E variant by digital droplet PCR (ddPCR), and for exon 11 mutations in *c-kit*. Furthermore, exons 2 and 3 of *KRAS* and *NRAS* were analysed by Sanger sequencing. Copy number variations (CNV) of *KITLG* in genomic DNA were analysed from nine dogs. The *BRAF* V595E variant was absent and in *c-kit*, a single nucleotide polymorphism was found in 16/70 tumours (23%). The number of copies of *KITLG* varied between 4 and 6. *KRAS* exon 2 codons 12 and 13 were mutated in 22/86 (25.6%) of the melanomas examined. Other mutually exclusive *RAS* mutations were found within the hotspot loci, i.e., *KRAS* exon 3 codon 61: 2/55 (3.6%); *NRAS* exon 2 codons 12 and 13: 2/83 (2.4%); and *NRAS* exon 3 codon 61: 9/86 (10.5%). However, no correlation could be established between histological malignancy criteria, survival times and the presence of *RAS* mutations. In summary, canine digital melanoma differs from molecular genetic data of canine oral melanoma and human melanoma, especially regarding the proportion of *RAS* mutations.

**Keywords:** canine; acral; mutation; tumour; *BRAF*; *KRAS*; *NRAS*; *c-kit*; CNV; *KITLG*



**Citation:** Conrad, D.; Kehl, A.; Beitzinger, C.; Metzler, T.; Steiger, K.; Pfarr, N.; Fischer, K.; Klopffleisch, R.; Aupperle-Lellbach, H. Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 56. <https://doi.org/10.3390/vetsci9020056>

Academic Editor: David J. Argyle

Received: 6 December 2021

Accepted: 26 January 2022

Published: 30 January 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Melanomas are malignant neoplasms originating from melanocytes and are often found in the oral cavity, on the skin, at the eyes or the digits [1]. Pathogenesis of canine melanocytic neoplasms depends on the site [1] and the coat colour [2]. Furthermore, occurrence, breed predisposition and prognosis vary depending on the site of melanocytic neoplasms [1]. Cutaneous and ocular melanocytic neoplasms are mainly benign [1,3] and are commonly located at the head, ventral abdomen, scrotum or the eye [1]. In contrast, oral melanomas are highly aggressive, and benign variants are rare [1,4]. Melanocytic neoplasms of the toe have an intermediate aggressiveness: Nishiya et al. [1] stated that they appear to be malignant in 5–58% of cases. Breed predispositions have been described in Schnauzers [5], Irish Setters [5,6], Golden Retrievers [6], Rottweilers and Labrador Retrievers [7].

Various mutations have already been identified in human melanoma and to some extent also in canine melanoma, as explained below. In humans, the *BRAF* V600E variant is well known as a common cause of tumour formation, as it is a T to A transversion in exon 15, resulting in the amino acid substitution of valine by glutamic acid at codon 600 [8,9]. This *BRAF* variant, in the past also referred to as V599E, is detectable in about 60% of human

melanomas [10–13] and activates MEK as a part of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [8]. This variant is of special therapeutic interest, because vemurafenib, an inhibitor specifically targeting the activated step of the MAPK pathway induced by the mutated BRAF protein, is available, and treating human melanoma patients with this drug results in a transient remission of the disease [14,15]. The canine *BRAF* V595E mutation is orthologous to human *BRAF* V600E with a transversion from T to A in exon 15 [9]. This somatic mutation was specifically found in canine urothelial and prostatic carcinoma, but only rarely in other canine tumours [9].

The MAPK pathway is activated by *RAS* genes and *RAS* proteins (especially *KRAS*/*NRAS*/*HRAS*) are upstream of the *RAF* proteins within the signal transduction [8]. According to a review by Downward [16], *RAS* proteins show somatic mutations in human cancer in up to 20% of cases. Point mutations in codons 12, 13 and 61 within the *RAS* genes have already been identified as oncogenes in human cancers [17]. In human melanomas, mutations of *NRAS* (10–15%) and *KRAS* (2%) are detectable, with *NRAS* having the substitution L61Q in about 80% of cases while G12V accounts for about 77% of the *KRAS* mutations according to a review by Cicenas et al. [18]. Molecular genetic studies are also available for human acral melanoma. *NRAS* mutations are frequently found (27.9%), while *HRAS* or *KRAS* mutations are only present in less than 5% of cases [19]. Mayr et al. [20] identified *NRAS* exon 2 codon 61 mutations in 2 of 16 dogs with cutaneous malignant melanoma, located in lumbar and scrotal regions. In contrast to this, Escobar et al. [21] did not find any *KRAS* or *NRAS* mutations in 11 canine malignant melanomas (site not reported). Additionally, *RAS* mutations have been described in two canine cutaneous melanomas (one *KRAS* and one *NRAS*) and in three melanomas of the digits (two *KRAS* and one *NRAS*) [22].

The proto-oncogene *c-kit* encodes the transmembrane receptor tyrosine kinase c-Kit (CD117) [23], while *KITLG* encodes stem cell factor (SCF) as a ligand of the tyrosine-kinase receptor c-Kit [24]. c-Kit is expressed in numerous cell types such as mast cells, melanocytes, and interstitial cells of Cajal [25]. In melanocytes, the proto-oncogene *c-kit* is thought to be involved in the regulation of pigmentation, migration, differentiation, survival, and proliferation [25]. Mutations of this gene have been identified in human mucosal melanoma [26–28] and also in human acral melanoma [26,28]. In canine melanoma, gain-of-function *c-kit* mutations have been found in a limited number of cases [29–31]. Smedley et al. [30] identified 85 variants in *c-kit* in canine oral melanomas, including 9 non-synonymous mutations.

*KITLG* is physiologically involved in postnatal cutaneous melanogenesis and in the terminal differentiation of follicular epithelial melanocytes, making it significant for the determination of canine coat colour [32]. Karyadi et al. [33] identified a copy number variation (CNV) at the *KITLG* locus, which is likely to be responsible for the high risk of black Poodles to develop digital squamous cell carcinoma (DSCC). They found an increased risk for DSCC in dogs with more than four copies of the *KITLG* gene. Dark-coloured dogs have a well-known predisposition for DSCC, which also shows a more aggressive histological picture in such breeds [34]. *KITLG* mutations have not been investigated in canine melanoma so far.

As it is generally known that there are differences between melanocytic neoplasms of different sites [1], the first oncogenetic studies of canine oral melanoma may not be representative for digital melanoma in dogs. In addition, the number of canine digital melanomas that have been addressed in the available literature is small [5,35–37]. Thus, the aim of our retrospective study was to investigate the occurrence of genetic aberrations of *BRAF*, *c-kit*, *KITLG*, *NRAS* and *KRAS* in canine digital melanoma. The hypothesis was that their oncogenic mechanisms may differ from melanomas of other sites, particularly oral ones. Furthermore, the molecular genetic results should be compared to their human counterparts. For this we used formalin-fixed toes with melanomas, which were submitted for routine diagnostics during the years 2014–2021 to Laboklin GmbH & Co. KG, Bad Kissingen, Germany and corresponding blood samples as far as available.

## 2. Materials and Methods

Malignant melanomas of the toe/nailbed from 86 dogs were included in this retrospective study. Inclusion criteria were a clear histopathological diagnosis and the availability of a paraffin-embedded tumour block before decalcification. Melanomas of the skin of the limb which did not affect the nailbed, or the bone were excluded. Age, sex, breed and further information, if available, were collected. For additional information, the veterinarians were contacted by telephone. Coat colour, exact site of the digital mass and a short report of the clinical course were documented whenever possible.

Blood samples of nine dogs with digital melanoma were available from routine diagnostics (presurgical or geriatric screening). As all samples (toes and blood) were submitted for routine diagnostic purposes, ethics committee approval was not required. All the material used was no longer needed for diagnostics.

### 2.1. Histopathology

Claws were trimmed according to Kamstock et al. [38] and decalcified using Osteomoll® rapid decalcifier solution for histology (Merck, Darmstadt, Germany) over a period of 24–72 h. Representative sample sites were embedded in paraffin wax and processed for routine histopathological examination according to standard procedures. From each toe, one non-decalcified tumour site was used for further molecular genetic investigations. Sections were stained with haematoxylin and eosin (HE) and histologically evaluated by trained veterinary pathologists during routine diagnostics and reevaluated by H.A.-L. Bleaching with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was performed for 24–72 h, if necessary, to detect nuclear atypia or mitoses if pigmentation was too intensive. Representative sites were characterised according to morphological criteria (pigmentation, mitotic count, nuclear atypia, and histomorphological type) as described by Spangler and Kass [3].

### 2.2. Molecular Genetic Methods

#### 2.2.1. BRAF Mutation, c-kit Gene Mutation

Paraffin-embedded samples were prepared for DNA extraction using the QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Isolated DNA was examined for the presence of the *BRAF* mutation c.1784T > A by digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) using a mutation-specific TaqMan® assay as described by Mochizuki et al. [39]. Analysis was performed using DropletReader (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) and QuantaSoft™ Software (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany). The sequence of exon 11 of *c-kit* (ENSCAFT00030034940.1) was analysed by PCR amplification and subsequently by Sanger sequencing. Primers are listed in Table 1. Bidirectional Sanger sequencing of all PCR products was performed on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to standard protocols. Mutational screening for *BRAF* and *c-kit* was done at the Department of Molecular Biology, Laboklin GmbH & Co. KG, Bad Kissingen, Germany.

#### 2.2.2. NRAS/KRAS Mutation Analysis

Referring to the genome CanFam3.1, melanoma samples were analysed for mutations in exons 2 and 3 of *NRAS* (ENSCAFT00000015144.4) and *KRAS* (ENSCAFT00000010525.4), respectively, by Sanger sequencing at the Institute of Pathology, Technische Universität München, Germany. DNA was isolated from a microdissected section of a tumour tissue block from areas in which a high tumour cell concentration (at least 60% tumour cell content, median: 80%, range: 60–95%) had been microscopically identified. DNA isolation was performed using the Maxwell 16 RSC extraction system (Promega, Madison, WI, USA). DNA quantity was measured by a QuBit 4.0 system and the QuBit high sensitivity assay (both: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All exons were amplified with the primers listed in Table 1 and with 10–20 ng of DNA as input and an annealing temperature of 60 °C. Bidirectional Sanger sequencing of all PCR products was subsequently conducted

on an ABI 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to standard protocols.

**Table 1.** Primer/Probe sequences used for the analysis of *NRAS*, *KRAS*, *c-kit* and *KITLG* genes.

Gene	Primer/Probe	Sequence
<i>NRAS</i> exon 2	Forward	5'-CGCCCATTAAACCTAATTGC-3'
	Reverse	5'-ACCAAAAAGCCAGAGGTAGGG-3'
<i>NRAS</i> exon 3	Forward	5'-ATCTCCTACCCTCCACACC-3'
	Reverse	5'-GGCAAATACACAGAGGAAGCC-3'
<i>KRAS</i> exon 2	Forward	5'-AAAAGGTGTTGATAGAGTGGGTATAC-3'
	Reverse	5'-AAATGGGCCTGCACAAATC-3'
<i>KRAS</i> exon 3	Forward	5'-ACTGTGTTTCTCCCTTCTCAGG-3'
	Reverse	5'-GCCCTCGATGTCATTTTATTATTTC-3'
<i>c-kit</i> exon 11	Forward	5'-CCCATGTATGAAGTACAGTGGAAAG-3'
	Reverse	5'-GTTCCCTAAAGTCATTGTTACACG-3'
CNV <i>KITLG</i>	Forward	5'-TGCACAAGGGAGAAGGGTTG-3'
	Reverse	5'-AGATGGTCCTGGGAAACCA-3'
	Probe	5'-FAM-TGGCTGGGGACAGAAGCAATG-BBQ650-3'

### 2.2.3. Copy Number Variation Analysis of *KITLG*

Genomic DNA was isolated from ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) blood with the MagNA Pure 96 system using a DNA Tissue Lysis Buffer and viral NA Small kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Copy number quantification of the *KITLG*-CNV was performed by ddPCR using TaqMan<sup>®</sup> assays specific for the *KITLG*-CNV sequence and proto-oncogene 1 (*ETS1*) as reference gene as described by Bannasch et al. [32]. An additional assay was designed for *KITLG*-CNV using the CanFam3.1 reference genome. Primers and the probe are listed in Table 1. The copy number was determined using DropletReader (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) and QuantaSoft<sup>™</sup> Software (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany). Analysis of the samples was performed at the Department of Molecular Biology, Laboklin GmbH & Co. KG, Bad Kissingen, Germany; with both assays and *ETS1* as reference, each in duplicate. Two independent in-house studies consistently demonstrated that both the inter- and intra-assay spearman correlation between the two methods (Bannasch et al. [32] and Karyadi et al. [33]) was highly significant ( $p < 0.001$ ). Therefore, we calculated the median from all four measurements (two per method) to obtain robust CNV estimates.

### 2.3. Statistical Analysis

Statistical significance analyses were evaluated using IBM SPSS Statistics (version 26). Comparisons between *RAS* mutations (*KRAS* and *NRAS* combined) and *KRAS* and the characteristics of degree of pigmentation, mitotic count and degree of nuclear atypia were performed with the Mann-Whitney U test. The association of *RAS*/*KRAS* mutations and histomorphological type was investigated by Fisher's exact test. The value  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Survival times were determined using the Kaplan–Meier plot and matched by the logrank test. The significance level was  $p < 0.05$ , the number of degrees of freedom was 1.

## 3. Results

### 3.1. Case Description, Clinical Data, and Survival Time

Toes from 86 dogs were collected for the study. Clinical data were often incomplete because the animals were only presented to the clinics for toe amputation. As far as available, details are listed in the suppl. Table. The age ranged from five to 15 years, with a

median of 11 years. In three cases, the age was unknown. The cohort included 36 intact and 15 castrated male dogs as well as 18 intact and 16 spayed female dogs. Sex was unknown in one case. The following breeds were represented: 23 mongrels, 15 Labrador Retrievers, 10 Giant Schnauzers, seven Rottweilers, four Golden Retrievers, three Irish Terriers, three Sheepdogs (not specified), two Bernese Mountain Dogs, two Cocker Spaniels and two Poodles. There was one animal of each of the following breeds: Airedale Terrier, Belgian Shepherd, Bullmastiff, Cairn Terrier, Cane Corso, Doberman, French Bulldog, German Hunting Terrier, German Shepherd, Gordon Setter, Havanese, Miniature Schnauzer, Pinscher, Scottish Terrier, and a Tibetan Terrier. A large proportion of the animals had a black coat colour ( $n = 31$ ). The others were black & tan ( $n = 15$ ), yellow ( $n = 8$ ), fawn ( $n = 6$ ), brown ( $n = 5$ ), tricolour ( $n = 2$ ) and white ( $n = 2$ ). In 17 cases, the coat colour could not be verified anymore.

Melanomas affected the forelimb ( $n = 54$ ) more often than the hindlimb ( $n = 23$ ). In nine cases, the relevant information could not be retrieved. The further clinical course as well as the current health status could be determined in 66 cases and were unknown in the remaining 20 cases. At the time of data collection, 15 dogs were still alive with a median follow-up time of 137 days (range: 19–639 days). 22 animals died because of progressive tumour disease with associated metastasis. Metastases were not clearly localised ( $n = 11$ ), affected the lungs ( $n = 9$ ), spinal cord ( $n = 1$ ), or the tail ( $n = 1$ ). Another 29 dogs died for other reasons (e.g., cardiac or renal insufficiency). Of all dogs that died, the one-year survival rate was 24% (12 dogs) and the two-year survival rate was 12% (6 dogs). Within the group of animals that died with reported metastasis, three (14%) survived one year and one (5%) survived two years.

### 3.2. Pathological Findings

The melanomas of the toes were mostly 0.5–2.0 cm in diameter, but some neoplasms reached a size of up to  $5.5 \times 5.5 \times 5.5$  cm. The claw was detached in 40% of cases. Neoplasms affected the nailbed or the paw, and distal phalanges were mostly destructed (Figure 1). The degree of pigmentation was low ( $n = 48$ ), moderate ( $n = 17$ ), intense ( $n = 6$ ) or varied greatly within the neoplasm ( $n = 15$ ) (Figure 1d). In 60 tumours, 2–15 mitotic figures/10 high-power field (HPF) were counted. In 20 tumours, the mitotic count was 21–39/10 HPF and in six cases, the mitotic count was 44–65/10 HPF (Table S1). Nuclear atypia was mild ( $n = 14$ ), moderate ( $n = 48$ ) or severe ( $n = 24$ ). Most melanomas had a dominant epithelioid morphology ( $n = 44$ ). In 14 cases, the tumour cells were mostly spindle-shaped. Round cell morphology ( $n = 9$ ) or balloon cell type ( $n = 1$ ) were rare. In the remaining 18 cases, morphology was a mixture of these types. Margins were clean in 69 dogs, narrow (<3 mm) in seven tumours and infiltrated by tumour cells in 10 cases.

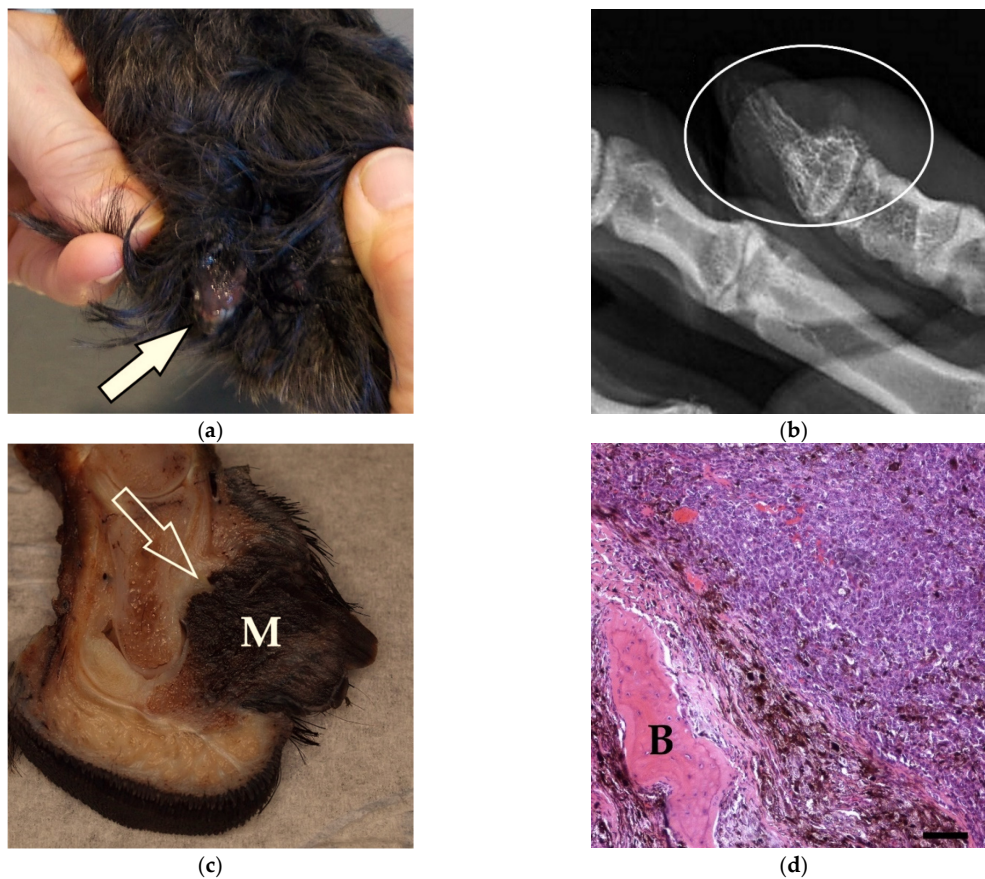
The different histological criteria were statistically analysed with regard to their influence on the median survival time. Dogs with melanomas larger than 1 cm in diameter (median: 151 days;  $n = 11$ ) and those with tumour cells detectable at the surgical margins (median: 72 days;  $n = 4$ ) had lower survival times than animals with smaller melanomas (median: 274 days;  $n = 5$ ) and clean margins (median: 183 days;  $n = 15$ ). However, due to the low number of cases, statistical significance was not reached.

### 3.3. Genetic Analysis

Wild type *BRAF* V595E was detected in 81 samples. In five cases, PCR failed, as not enough DNA could be extracted for amplification.

In 16 of 70 melanomas, we identified a silent *c-kit* gene alteration in exon 11. In 16 other samples, no PCR product could be amplified. The *c-kit* variant in exon 11 was c.1731C > T (counterpart in human molecular pathology: p.Y577Y) and either heterozygous ( $n = 10$ ) or homozygous ( $n = 6$ ). This variant corresponds to a putative germline variant listed in ENSEMBL (SNP-No.: rs853024368; <https://www.ensembl.org/index.html>, accessed on 22 November 2021).





**Figure 1.** Malignant melanoma of the fifth toe of the hindlimb of a 10-year-old Giant Schnauzer (Dog No. 48): (a) The claw horn has detached and the neoplastic tissue is exposed (arrow; © Dr. Blasberg, Kleintierpraxis Bad Honnef); (b) The claw bone shows significant osteolysis in the X-ray (circle; © Dr. Blasberg, Kleintierpraxis Bad Honnef); (c) Longitudinal cut of the formalin-fixed amputated digit with a  $1.4 \times 1.0 \times 1.4$  cm black mass (M) originating from the nailbed and infiltrating the bone (arrow); (d) Histologically, the neoplastic cells show varying degrees of pigmentation and infiltration of the bone (B) (HE, bar = 200  $\mu$ m).

In *KRAS* and *NRAS* genes, exons 2 and 3 were amplified and sequenced. Most mutations were detected in the *KRAS* gene (Table 2). All identified *RAS* mutations were mutually exclusive—combinations did not occur.

*KRAS* mutations in exon 2 (codons 12 and 13) were found in 22 cases which are listed in Table 3. *KRAS* mutations in exon 3 (codon 61) were found in the mixed cell type melanoma of the third toe of the right forelimb of an eight-year-old male German Shepherd (No. 80; survival time: 55 days) and in one round cell type melanoma of the fifth toe of the right forelimb of an eight-year-old female mongrel (No. 9; survival time: 110 days). The amount of pigments was moderate in the first case and low in the second. The mitotic count was 31/10 HPF in the German Shepherd and 5/10 HPF in the mongrel.

**Table 2.** Overview of all cases with detected *RAS* mutation ( $n = 35$ ).

Gene	Mutation	Wild Type	Not Done
<i>KRAS</i> exon 2 codon 12	17	64	0
<i>KRAS</i> exon 2 codon 13	5		
<i>KRAS</i> exon 3 codon 61	2	53	31
<i>NRAS</i> exon 2 codon 12	1	81	3
<i>NRAS</i> exon 2 codon 13	1		
<i>NRAS</i> exon 3 codon 61	9	77	0

**Table 3.** Characteristics of dogs with *KRAS* exon 2 mutation (codons 12 and 13) in digital melanoma ( $n = 22$ ).

Dog No.	Codon	Breed (Coat Colour)	Age (y)	Sex	Toe	Morphology	Pigment (Degree)	Mitoses/10 HPF	Survival Time (d)
40	12	GS	11	MC	RF	mixed	2	7	157
39	12	GS	8	M	LF	epithelioid	2	3	72
25	12	LR	12	M	RH	epithelioid	1	13	338
26	12	LR (U)	12	F	LF	spindle cell	1	4	274
27	12	LR (black)	14	M	RF	epithelioid	1	5	A
24	12	LR (yellow)	10	FS	RF	epithelioid	1	5	1304
49	12	RW	8	F	RF	epithelioid	1	24	U
77	12	DM	U	F	LF	mixed	2	5	U
75	12	CT	11	MC	LF	epithelioid	V	7	1016
73	12	BS	9	M	LH	epithelioid	1	13	A
1	12	MG (black)	13	M	LF	mixed	1	58	U
2	12	MG (U)	8	MC	RF	epithelioid	1	25	40
3	12	MG (U)	10	F	LF	round	1	15	142
4	12	MG (U)	9	FS	RF	mixed	2	22	U
5	12	MG (U)	9	M	RH	epithelioid	3	3	1079
6	12	MG (U)	13	M	U	round	1	22	A
7	12	MG (b&t)	9	F	LF	epithelioid	3	4	189
8	13	MG (U)	10	MC	RH	epithelioid	V	9	A
50	13	RW	5	F	U	epithelioid	1	65	194
51	13	RW	11	M	LH	epithelioid	1	15	18
28	13	LR (black)	12	M	LH	epithelioid	1	9	504
82	13	Havanese	15	M	LH	round	1	23	U

Abbreviations: y: years; d: days; M: male; MC: male castrated; F: female; FS: female spayed; RF: right forelimb; RH: right hindlimb; LF: left forelimb; LH: left hindlimb; U: unknown; A: alive; V: varying; b&t: black and tan; BS: Belgian Shepherd; CT: Cairn Terrier; DM: Doberman; GS: Giant Schnauzer; LR: Labrador Retriever; MG: mongrel; RW: Rottweiler.

*NRAS* mutations in exon 2 (codons 12 and 13) were detected in digital melanomas of the right forelimbs of two Golden Retrievers. Codon 12 mutation was found in a low pigmented, epithelioid melanoma with 8 mitoses/10 HPF of an eight-year-old male Golden Retriever (No. 56; unknown survival time). Codon 13 mutation was present in a low pigmented, mixed cell type melanoma with five mitoses/10 HPF of a six-year-old female spayed Golden Retriever (No. 57). This dog was still alive 12 months after diagnosis. *NRAS* mutations in exon 3 (codon 61) were found in nine cases which are summarised in Table 4.



**Table 4.** Characteristics of dogs with *NRAS* exon 3 mutation (codon 61) in digital melanoma ( $n = 9$ ).

Dog No.	Breed (Coat Colour)	Age (y)	Sex	Toe	Morphology	Pigment (Degree)	Mitoses/10 HPF	Survival Time (d)
41	GS	9	M	RH	epithelioid	1	34	83
42	GS	10	MC	LF	epithelioid	3	6	52
43	GS	14	M	U	epithelioid	V	21	U
66	BMD	8	M	LH	spindle cell	2	4	U
63	Sheepdog	9	M	LF	round	V	9	48
70	Poodle	11	M	RF	mixed	3	4	U
68	CS	11	FS	U	spindle cell	2	5	U
10	MG (b&t)	14	M	LF	mixed	2	3	840
11	MG (U)	8	MC	RF	epithelioid	3	3	A

Abbreviations: y: years; d: days; M: male; MC: male castrated; FS: female spayed; RF: right forelimb; RH: right hindlimb; LF: left forelimb; LH: left hindlimb; U: unknown; A: alive; V: varying; b&t: black and tan; BMD: Bernese Mountain Dog; CS: Cocker Spaniel; GS: Giant Schnauzer; MG: mongrel.

Statistical analysis showed that the degree of pigmentation, mitotic count, degree of nuclear atypia or histomorphological type of digital melanomas, as well as the survival time, were neither significantly associated with *RAS* mutations in general nor with *KRAS* mutations. As there were only 11 cases of *NRAS* mutation, statistical analysis was not performed for *NRAS* mutations alone to avoid non-reliable data. Regarding the survival times, an empirical median of 142 days was calculated for *RAS* mutants (*KRAS* and *NRAS*), and 183 days for wild types. However, the difference was not statistically significant.

### 3.4. Copy Number Variations (CNV) of *KITLG*

EDTA blood samples were available from nine animals and examined for copy number variations (CNV) of the *KITLG* locus. The detected copy numbers varied between four and six (Table 5). Two dogs (Nos. 27 and 73) had copy numbers of five and six, respectively, and showed a mutation in *KRAS* exon 2 codon 12. Furthermore, a 14-year-old Giant Schnauzer (No. 43) had six copies of the *KITLG* gene locus in addition to a mutation in *NRAS* exon 3 codon 61. In two other cases, mutations were found in *NRAS* exon 2 codon 13 (No. 57) and *NRAS* exon 3 codon 61 (No. 11), combined with a CNV of four (Table 5).

**Table 5.** Characteristics of dogs analysed for CNV of *KITLG* ( $n = 9$ ).

Dog No.	Copy Number	<i>RAS</i> Mutation	Breed (Coat Colour)	Age (y)	Sex	Toe	Morphology	Pigment (Degree)	Mitoses/10 HPF	Survival Time (d)
43	6	<i>NRAS</i> exon 3 codon 61	GS	14	M	U	epithelioid	V	21	U
48	5	-	GS	10	M	RH	epithelioid	2	2	A
73	5	<i>KRAS</i> exon 2 codon 12	BS	9	M	LH	epithelioid	1	13	A
57	4	<i>NRAS</i> exon 2 codon 13	GR	6	FS	RF	mixed	1	5	A
27	6	<i>KRAS</i> exon 2 codon 12	LR (black)	14	M	RF	epithelioid	1	5	A
61	5	-	IT	13	M	LF	epithelioid	0	3	A
11	4	<i>NRAS</i> exon 3 codon 61	MG (U)	8	MC	RF	epithelioid	3	3	A

Table 5. Cont.

Dog No.	Copy Number	RAS Mutation	Breed (Coat Colour)	Age (y)	Sex	Toe	Morphology	Pigment (Degree)	Mitoses/ 10 HPF	Survival Time (d)
22	5	-	MG (b&t)	15	M	LH	spindle cell	1	15	A
21	4	-	MG (black)	8	F	RF	round	1	15	A

Abbreviations: y: years; d: days; M: male; MC: male castrated; F: female; FS: female spayed; RF: right forelimb; RH: right hindlimb; LF: left forelimb; LH: left hindlimb; U: unknown; A: alive; V: varying; b&t: black and tan; BS: Belgian Shepherd; GR: Golden Retriever; GS: Giant Schnauzer; IT: Irish Terrier; LR: Labrador Retriever; MG: mongrel.

#### 4. Discussion

In this study, the goal was to identify various somatic mutations in canine digital melanoma and to compare these with other canine melanomas, especially oral melanoma. Additionally, the correlation between the mutations and histological criteria of malignancy was investigated. Furthermore, CNV of *KITLG* were analysed as a germline mutation. The most striking result was the high proportion of *KRAS* mutations in canine digital melanoma and an increased copy number of *KITLG* (4–6) was observed. A statistically significant correlation between detected mutations and histomorphological criteria of malignancy and survival time was not found.

Melanoma is a genetically complex disease and the molecular context of *BRAF*, *RAS* and *c-kit* gene mutation may affect the response to targeted treatment and even immunology-based therapies in man [40,41]. This is the first study investigating various mutations in a larger number of digital melanomas in dogs. Until now, only few molecular genetic analyses have been performed to compare canine melanomas to their human counterparts [2,42–45]. Moreover, these studies were limited by their retrospective characterisation of cases without complete clinical and pathological data.

In general, the number of canine digital melanomas reported in the literature is rather low (Wobeser et al.  $n = 52$  [35]; Marino et al.  $n = 24$  [36]; Schultheiss  $n = 27$  [37]; Henry et al.  $n = 10$  [5]). However, in a study on 2912 digital lesions in dogs [7], our working group identified 196 malignant melanomas. None of these studies used molecular methods to examine the digital melanomas. Hendricks et al. [22] analysed *RAS*, *BRAF* and *c-kit* gene mutations, among others, in three digital melanomas, and Chu et al. [29] investigated *c-kit* mutation in three digital melanomas. It is well known that canine melanocytic neoplasms show very different clinical and pathological features at different sites [1,3]. Thus, the hypothesis of the present study was that canine digital melanomas may have different oncogenetic mechanisms than, for instance, oral melanomas. Human acral melanomas have also been studied at the genetic level, with mutations of *BRAF* (21.3%) and *KIT* genes (11.5%; 50% within exon 11) standing out. Here, too, *NRAS* mutations in codons 12, 13 and 61 were found (27.9%), but only less than 5% of cases had activating mutations in *HRAS* or *KRAS* [19]. The mutational analysis of the present study was therefore based on the data on human melanoma and studies on canine, mostly oral, melanoma.

Within the canine digital melanomas in our study, we found no *BRAF* V595E variant. Hendricks et al. [22] did not find any *BRAF* mutations in 37 canine melanomas—including three originating from the digits. No *BRAF* mutation was detected in canine oral melanoma (Gillard et al.  $n = 77$  [2]; Shelly et al.  $n = 17$  [46]). In contrast, Mochizuki et al. [39] found one *BRAF* mutation in a canine cutaneous melanoma and two in mucosal melanomas, studying a total of 54 melanomas. Thus, mutations in *BRAF* seem to not play a relevant role in the pathogenesis of digital melanoma in dogs.

In our screening of canine digital melanomas for *c-kit* mutations, we only found a common polymorphism whose frequency in the dog population is reported to be 18% (<https://www.ebi.ac.uk/eva/?eva-study=PRJEB24066>, accessed on 25 November 2020). Comparison with past studies is only possible to a limited extent, because there are currently only a few studies available that have investigated the presence of *c-kit* mutations in canine melanoma. In those studies, digital melanomas were not represented at all [2,30,45,47,48],

or they were clearly underrepresented [29]. In summary, *c-kit* mutations may occur in canine melanoma [29,30], but seem to play a minor role. However, no *c-kit* mutation was detected in digital melanoma in previous studies [29]. Since only tumour tissue and no corresponding normal tissue was examined in our studies, it is not possible to verify whether a *c-kit* mutation is of somatic origin or a germline mutation. As we only detected silent alterations in our samples, it was not further investigated and may be clarified in future studies.

To the best of our knowledge, this is the first investigation of copy number variations of *KITLG* in dogs affected by melanoma. The number of copies varied between four and six in the nine dogs from which blood samples were available for genetic analysis. Mutations in *KITLG* have been identified as a factor in the oncogenesis of melanoma in man [49]. Germline mutations relevant for tumour predispositions have already been identified in dogs [44]. It is important to keep in mind that a germline mutation may reflect a genetic predisposition rather than the direct somatic oncogenetic pathway like *BRAF* or *c-kit* mutations. Bannasch et al. [32] found that CNV of *KITLG* are linked to a variation in the dog's coat colour and pointed out that *KITLG* is an important factor in melanogenesis. The median number of copies varied from two to eight, depending on the breed and the coat colour [32]. Furthermore, CNV at the *KITLG* locus have been detected in dogs diagnosed with canine digital squamous cell carcinoma and seem to be involved in its development [33]. In our study, five of nine dogs examined for CNV of *KITLG* had a dark coat colour ( $n = 4$  black;  $n = 1$  black & tan) and four of these dogs had more than four copies. Within the remaining four of nine dogs (coat colour:  $n = 2$  fawn;  $n = 1$  yellow;  $n = 1$  unknown), only two dogs were found with more than four copies. Black-coated breeds such as Beauce Shepherds [2], Rottweilers or Schnauzers [2,50] appeared to be predisposed to malignant melanoma in any site while pale-coated dogs, especially solid white-haired breeds, were underrepresented [2]. This is also reflected by the animals in our study, in which most dogs were black ( $n = 31$ ) or black & tan ( $n = 15$ ) and only 23 dogs were light coloured. As discussed by Grassinger et al. [7], the high number of Giant and Standard Schnauzers in our data set is due to their German origin.

Based on these data, we hypothesise that CNV of *KITLG* may be involved in the development of melanoma in dogs with dark and black coats. However, the lack of control data makes interpretation of the results difficult. Thus, at the moment, it is impossible to give any breeding recommendations to minimise the risk of digital melanoma in certain dog breeds.

In three canine digital melanomas, Hendricks et al. [22] detected two cases of *KRAS* mutations and one *NRAS* mutation. In our study, a much larger sample size was processed: Overall, RAS mutations were detected in 40.7% of the tumours examined. *KRAS* exon 2 codons 12 and 13 mutation were detected in 22 of 86 dogs (25.6%) and *KRAS* exon 3 codon 61 mutation in two of 55 cases (3.6%). *NRAS* exon 2 codons 12 and 13 were mutated in two of 83 cases (2.4%), and *NRAS* exon 3 codon 61 mutation was found in nine of 86 cases (10.5%). These results may indicate that RAS mutation could be a driver of mutation in canine digital melanoma. Interestingly, these mutations were mutually exclusive, and we did not identify an additional somatic aberration in any other investigated gene (*BRAF*, *c-kit*).

A comparison to canine oral melanoma was also sought. Hendricks et al. [22] reported *KRAS* mutation rates of 3% in canine mucosal melanomas. Wong et al. [45] identified this mutation in 5% of all canine oral melanomas examined in their study. All variants affected the previously described hotspot loci. This supports our hypothesis that canine digital melanomas differ from oral (and mucosal) melanomas at the genetic level, especially regarding the clear difference of detectable *KRAS* mutations.

Since HRAS alterations are relatively rare in human tumours [16], we did not include this gene in our studies. However, this may be part of future research as our recent findings showed differences between human and canine digital melanoma.

In human medicine, promising results are already available in the field of RAS-targeted treatment of melanomas [14]. There are similar approaches for dogs as well. Wei et al. [51]

investigated the effect of dual MEK and PI3K/mTOR inhibition on canine melanoma cell lines with ERK and AKT/mTOR activation, and were able to inhibit tumour growth. The study also looked for NRAS mutations, which, however, only occurred in small numbers. Their presence or absence did not seem to be related to ERK activity. Fowles et al. [52] took a similar approach, examining dual inhibition of MAPK and PI3K/AKT in human and canine melanoma and reporting detectable inhibition in both species. They also discussed mutation-independent MAPK and PI3K/AKT activation. Further research in this area is already in progress and seems to be necessary.

The mutations found were examined regarding their diagnostic and prognostic relevance. It is well known that histological criteria, such as mitotic count or degree of pigmentation, can be used to differentiate between benign and malignant melanocytic neoplasms [53]. However, histological criteria, immunohistochemical expression patterns and other prognostic factors were not clearly correlated to survival time in dogs with digital melanomas. Furthermore, in our study, there was no statistically significant difference in the histological criteria (pigmentation, mitotic count, nuclear atypia, and histomorphological type) between dogs with or without *RAS* mutation. The same applied to the comparison of the *KRAS* mutant with the *KRAS* wild type. Thus, *KRAS* exon 2 and 3 mutations in canine digital melanomas probably have no prognostic relevance. Unfortunately, there were not enough cases with *NRAS* exon 2 and 3 mutations ( $n = 11$ ) to perform reliable statistics.

According to the literature, 32% of dogs with malignant digital melanoma had metastases at presentation and another 26% developed metastases after surgery [36]. Henry et al. [5] reported a metastasis rate of 40% at the time of diagnosis. Dogs with digital malignant melanoma were reported to have a one-year survival rate of 42% to 44% and a two-year survival rate of 11% to 13%, which reflects the high metastatic rate of the tumour [5,36].

The survival rate of all dogs, including those in which the melanoma diagnosis could not be determined as the confirmed cause of death, was 24% for one year and 12% for two years. The one- and two-year survival rates were 14% and 5%, respectively, within the group that died of melanoma, i.e., already had metastasis at the time of death. The survival rates determined in this study show a similar trend to previous literature [5,36] and confirm the poor prognosis of canine digital melanoma.

The present study was limited by its retrospective nature, where clinical data and exact survival times could only be requested retrospectively and were thus partly incomplete. Future studies could collect this information in a timely manner and make the data more precise. Thus, the statistical analysis of the diagnostic and prognostic relevance of *RAS* mutations was partly not feasible without producing unreliable data. Whole genome sequencing of digital melanoma in dogs would also be attractive, allowing even more potential genetic mutations to be investigated.

In summary, our initial hypothesis was that canine digital melanoma may differ in its molecular genetic pathway from oral melanoma. This hypothesis was accepted, since we found significantly more *KRAS* mutations in canine digital melanoma compared to data reported for oral melanoma. Furthermore, a difference is also obvious between canine and human acral melanoma, in which *BRAF* and *KIT* mutations occur more frequently.

## 5. Conclusions

It is already known that malignancy and prognosis of canine melanoma strongly depend on the site of the tumour. The present study showed that canine digital melanoma differs from oral melanoma at the molecular genetic level as well. Mutations of the *KRAS* gene are especially common. In contrast, mutations of *BRAF* and *c-kit* genes which are involved in human melanoma obviously do not play a role in the oncogenesis of canine digital melanoma.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vetsci9020056/s1>. Table S1: Case description, clinical and histomorphological findings of dogs with digital melanoma ( $n = 86$ ).

**Author Contributions:** Conceptualisation, H.A.-L., R.K. and K.S.; methodology, D.C., A.K., K.S., N.P. and K.F.; validation, A.K., N.P. and H.A.-L.; formal analysis, D.C., A.K., K.S., N.P., C.B. and R.K.; investigation, D.C., A.K., N.P., T.M. and H.A.-L.; resources, H.A.-L., K.S. and N.P.; data curation, D.C., C.B. and N.P.; writing—original draft preparation, D.C.; writing—review and editing, H.A.-L., K.S., N.P. and R.K.; supervision, H.A.-L.; project administration, H.A.-L.; funding acquisition, H.A.-L. and K.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by BAYERISCHE Forschungsförderung, grant number AZ-1365-18 within the Forschungsverbund Tumordiagnostik für individualisierte Therapie–FORITher, TP-4 (H.A.-L., C.B., K.F.). K.S. and T.M. received funding from SFB1335 (project number 360372040). K.F., K.S. and T.M. received funding from SFB1371 (project number 395357507).

**Institutional Review Board Statement:** Ethical review and approval were waived for this study due to submission of the samples as part of routine diagnostics at Laboklin GmbH & Co. KG. Supporting legal basis: RUF-55.2.2-2532-1-86-5.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data available upon request due to privacy/ethical restrictions.

**Acknowledgments:** We would like to thank our colleagues from the Institute of Pathology, Technische Universität München, Katharina Merkl and Anne Jacob, for the molecular work-up and Olga Seelbach for cutting. We would also like to thank Doreen Girndt for the linguistic revision.

**Conflicts of Interest:** N.P., Speaker Fee and Travelling Support: AstraZeneca, Illumina, Thermo Fisher Scientific, Roche, Bristol Myers Squibb; Advisory Boards: Bayer, Lilly, Novartis, Roche. K.S., Research Support: Roche; Advisory Board: TRIMT GmbH. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. The authors do offer diagnostic, genetic and pathology services.

## References

- Nishiya, A.T.; Massoco, C.O.; Felizzola, C.R.; Perlmann, E.; Batschinski, K.; Tedardi, M.V.; Garcia, J.S.; Mendonça, P.P.; Teixeira, T.F.; Zaidan Dagli, M.L. Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet. Sci.* **2016**, *3*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gillard, M.; Cadieu, E.; de Brito, C.; Abadie, J.; Vergier, B.; Devauchelle, P.; Degorce, F.; Dréano, S.; Primot, A.; Dorso, L.; et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2014**, *27*, 90–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Spangler, W.L.; Kass, P.H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet. Pathol.* **2006**, *43*, 136–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bostock, D.E. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet. Pathol.* **1979**, *16*, 32–40. [[CrossRef](#)]
- Henry, C.J.; Brewer, W.G., Jr.; Whitley, E.M.; Tyler, J.W.; Ogilvie, G.K.; Norris, A.; Fox, L.E.; Morrison, W.B.; Hammer, A.; Vail, D.M.; et al. Canine Digital Tumors: A Veterinary Cooperative Oncology Group Retrospective Study of 64 Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2005**, *19*, 720–724. [[CrossRef](#)]
- Smith, S.H.; Goldschmidt, M.H.; McManus, P.M. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet. Pathol.* **2002**, *39*, 651–678. [[CrossRef](#)]
- Grassinger, J.M.; Floren, A.; Müller, T.; Cerezo-Echevarria, A.; Beitzinger, C.; Conrad, D.; Törner, K.; Staudacher, M.; Aupperle-Lellbach, H. Digital Lesions in Dogs: A Statistical Breed Analysis of 2912 Cases. *Vet. Sci.* **2021**, *8*, 136. [[CrossRef](#)]
- Dhillon, A.S.; Hagan, S.; Rath, O.; Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 3279–3290. [[CrossRef](#)]
- Mochizuki, H.; Breen, M. Comparative Aspects of BRAF Mutations in Canine Cancers. *Vet. Sci.* **2015**, *2*, 231–245. [[CrossRef](#)]
- Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954. [[CrossRef](#)]
- Brose, M.S.; Volpe, P.; Feldman, M.; Kumar, M.; Rishi, I.; Guerrero, I.; Herlyn, M.; Minna, J.; Nicholson, A.; et al. BRAF and RAS Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6997–7000. [[PubMed](#)]
- Tsao, H.; Goel, V.; Wu, H.; Yang, G.; Haluska, F.G. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *122*, 337–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goel, V.K.; Lazar, A.J.F.; Warneke, C.L.; Redston, M.S.; Haluska, F.G. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 154–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Savoia, P.; Fava, P.; Casoni, F.; Cremona, O. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



15. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2507–2516. [[CrossRef](#)]
16. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bos, J.L. ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4682–4689. [[PubMed](#)]
18. Cicenias, J.; Tamosaitis, L.; Kvederaviciute, K.; Tarvydas, R.; Staniute, G.; Kalyan, K.; Meskinyte-Kausiliene, E.; Stankevicius, V.; Valius, M. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Med. Oncol.* **2017**, *34*, 26. [[CrossRef](#)]
19. Yeh, I.; Jorgenson, E.; Shen, L.; Xu, M.; North, J.P.; Shain, A.H.; Reuss, D.; Wu, H.; Robinson, W.A.; Olshen, A.; et al. Targeted Genomic Profiling of Acral Melanoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2019**, *111*, 1068–1077. [[CrossRef](#)]
20. Mayr, B.; Schaffner, G.; Reifinger, M.; Zwetkoff, S.; Prodinger, B. N-ras Mutations in Canine Malignant Melanomas. *Vet. J.* **2003**, *165*, 169–171. [[CrossRef](#)]
21. Escobar, H.M.; Günther, K.; Richter, A.; Soller, J.T.; Winkler, S.; Nolte, I.; Bullerdiek, J. Absence of Ras-gene Hot-spot Mutations in Canine Fibrosarcomas and Melanomas. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 3027–3028.
22. Hendricks, W.P.D.; Zismann, V.; Sivaprakasam, K.; Legendre, C.; Poorman, K.; Tembe, W.; Perdignes, N.; Kiefer, J.; Liang, W.; DeLuca, V.; et al. Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. *PLoS Genet.* **2018**, *14*, e1007589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Newman, S.J.; Jankovsky, J.M.; Rohrbach, B.W.; LeBlanc, A.K. C-kit expression in canine mucosal melanomas. *Vet. Pathol.* **2012**, *49*, 760–765. [[CrossRef](#)]
24. Yang, Z.; Shi, H.; Ma, P.; Zhao, S.; Kong, Q.; Bian, T.; Gong, C.; Zhao, Q.; Liu, Y.; Qi, X.; et al. Darwinian Positive Selection on the Pleiotropic Effects of KITLG Explain Skin Pigmentation and Winter Temperature Adaptation in Eurasians. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 2272–2283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Alexeev, V.; Yoon, K. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *J. Investig. Dermatol.* **2006**, *126*, 1102–1110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Beadling, C.; Jacobson-Dunlop, E.; Hodi, F.S.; Le, C.; Warrick, A.; Patterson, J.; Town, A.; Harlow, A.; Cruz, F.; Azar, S.; et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6821–6828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Antonescu, C.R.; Busam, K.J.; Francone, T.D.; Wong, G.C.; Guo, T.; Agaram, N.P.; Besmer, P.; Jungbluth, A.; Gimbel, M.; Chen, C.-T.; et al. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 257–264. [[CrossRef](#)]
28. Curtin, J.A.; Busam, K.; Pinkel, D.; Bastian, B.C. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 4340–4346. [[CrossRef](#)]
29. Chu, P.-Y.; Pan, S.-L.; Liu, C.-H.; Lee, J.; Yeh, L.-S.; Liao, A.T. KIT gene exon 11 mutations in canine malignant melanoma. *Vet. J.* **2013**, *196*, 226–230. [[CrossRef](#)]
30. Smedley, R.C.; Thaiwong, T.; Deeth, L.E.; Kiupel, M. Correlation between KIT Expression and c-Kit Mutations in 2 Subtypes of Canine Oral Melanocytic Neoplasms. *Vet. Pathol.* **2021**, *58*, 683–691. [[CrossRef](#)]
31. Tani, H.; Miyamoto, R.; Noguchi, S.; Kurita, S.; Nagashima, T.; Michishita, M.; Yayoshi, N.; Tamura, K.; Bonkobara, M. A canine case of malignant melanoma carrying a KIT c.1725\_1733del mutation treated with toceranib: A case report and in vitro analysis. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bannasch, D.; Affolter, V.; York, D.; Rebhun, R.; Grahn, R.; Weich, K.; Kallenberg, A. Pigment Intensity in Dogs is Associated with a Copy Number Variant Upstream of KITLG. *Genes* **2020**, *11*, 75. [[CrossRef](#)]
33. Karyadi, D.M.; Karlins, E.; Decker, B.; vonHoldt, B.M.; Carpintero-Ramirez, G.; Parker, H.G.; Wayne, R.K.; Ostrander, E.A. A copy number variant at the KITLG locus likely confers risk for canine squamous cell carcinoma of the digit. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cerezo-Echevarria, A.; Grassinger, J.M.; Beitzinger, C.; Klopffleisch, R.; Aupperle-Lellbach, H. Evaluating the Histologic Grade of Digital Squamous Cell Carcinomas in Dogs with Dark and Light Haircoat-A Comparative Study of the Invasive Front and Tumor Cell Budding Systems. *Vet. Sci.* **2020**, *8*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wobeser, B.K.; Kidney, B.A.; Powers, B.E.; Withrow, S.J.; Mayer, M.N.; Spinato, M.T.; Allen, A.L. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. *Vet. Pathol.* **2007**, *44*, 355–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Marino, D.J.; Matthiesen, D.T.; Stefanacci, J.D.; Moroff, S.D. Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981–1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1995**, *207*, 726–728. [[PubMed](#)]
37. Schultheiss, P.C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2006**, *18*, 422–425. [[CrossRef](#)]
38. Kamstock, D.A.; Ehrhart, E.J.; Getzy, D.M.; Bacon, N.J.; Rassnick, K.M.; Moroff, S.D.; Liu, S.M.; Straw, R.C.; McKnight, C.A.; Amorim, R.L.; et al. Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Vet. Pathol.* **2011**, *48*, 19–31. [[CrossRef](#)]
39. Mochizuki, H.; Kennedy, K.; Shapiro, S.G.; Breen, M. BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129534. [[CrossRef](#)]
40. Davies, M.A.; Gershenwald, J.E. Targeted therapy for melanoma: A primer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2011**, *20*, 165–180. [[CrossRef](#)]
41. Portelinha, A.; Thompson, S.; Smith, R.A.; Da Silva Ferreira, M.; Asgari, Z.; Knezevic, A.; Seshan, V.; de Stanchina, E.; Gupta, S.; Denis, L.; et al. ASN007 is a selective ERK1/2 inhibitor with preferential activity against RAS-and RAF-mutant tumors. *Cell Rep. Med.* **2021**, *2*, 100350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Prouteau, A.; André, C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes* **2019**, *10*, 501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hernandez, B.; Adissu, H.; Wei, B.-R.; Michael, H.; Merlino, G.; Simpson, R. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Schiffman, J.D.; Breen, M. Comparative oncology: What dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2015**, *370*, 20140231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wong, K.; van der Weyden, L.; Schott, C.R.; Foote, A.; Constantino-Casas, F.; Smith, S.; Dobson, J.M.; Murchison, E.P.; Wu, H.; Yeh, I.; et al. Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Shelly, S.; Chien, M.B.; Yip, B.; Kent, M.S.; Theon, A.P.; McCallan, J.L.; London, C.A. Exon 15 BRAF mutations are uncommon in canine oral malignant melanomas. *Mamm. Genome* **2005**, *16*, 211–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Brocca, G.; Poncina, B.; Sammarco, A.; Cavicchioli, L.; Castagnaro, M. KIT Somatic Mutations and Immunohistochemical Expression in Canine Oral Melanoma. *Animals* **2020**, *10*, 2370. [[CrossRef](#)]
48. Murakami, A.; Mori, T.; Sakai, H.; Murakami, M.; Yanai, T.; Hoshino, Y.; Maruo, K. Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. *Vet. Comp. Oncol.* **2011**, *9*, 219–224. [[CrossRef](#)]
49. Pho, L.N.; Leachman, S.A. Genetics of pigmentation and melanoma predisposition. *G. Ital. Dermatol. Venereol. Organo Uff. Soc. Ital. Dermatol. Sifiligr.* **2010**, *145*, 37–45.
50. Goldschmidt, M.; Goldschmidt, K.H. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In *Tumors in Domestic Animals*, 5th ed.; Meuten, D.J., Ed.; John Wiley & Sons Inc.: Ames, IA, USA, 2017; pp. 88–141.
51. Wei, B.-R.; Michael, H.T.; Halsey, C.H.C.; Peer, C.J.; Adhikari, A.; Dwyer, J.E.; Hoover, S.B.; El Meskini, R.; Kozlov, S.; Weaver Ohler, Z.; et al. Synergistic targeted inhibition of MEK and dual PI3K/mTOR diminishes viability and inhibits tumor growth of canine melanoma underscoring its utility as a preclinical model for human mucosal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2016**, *29*, 643–655. [[CrossRef](#)]
52. Fowles, J.S.; Denton, C.L.; Gustafson, D.L. Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. *Vet. Comp. Oncol.* **2015**, *13*, 288–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Smedley, R.C.; Spangler, W.L.; Esplin, D.G.; Kitchell, B.E.; Bergman, P.J.; Ho, H.-Y.; Bergin, I.L.; Kiupel, M. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: A comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet. Pathol.* **2011**, *48*, 54–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Tab. 3: Ergänzendes Material: Case description, clinical and histomorphological findings of dogs with digital melanoma (n = 86)

Dog No.	Breed	Age (y)	Sex M: male intact MC: male castrated F: female intact FS: female spayed	Phenotypical haircoat colour	Affected digit RF: right forelimb RH: right hindlimb LF: left forelimb LH: left hindlimb	Affected toe	Reported metastasis	Degree of pigmentation L: low M: moderate I: intense V: varying	Mitoses/10 HPF	Nuclear atypia MI: mild MO: moderate S: severe	Cell morphology E: epithelioid S: spindle shaped R: round B: balloon M: mixed	Margins C: clean I: infiltrated N: narrow
1	Mongrel	13	M	black	LF	U		L	58	MI	M	C
2	Mongrel	8	MC	U	RF	U		L	25	MI	E	C
3	Mongrel	10	F	U	LF	2 <sup>nd</sup>	Yes	L	15	MO	R	C
4	Mongrel	9	FS	U	RF	3 <sup>rd</sup>		M	22	S	M	I
5	Mongrel	9	M	U	RH	U		I	3	MI	E	C
6	Mongrel	13	M	U	U	U		L	22	S	R	C
7	Mongrel	9	F	black & tan	LF	U		I	4	MO	E	C
8	Mongrel	10	MC	U	RH	U		V	9	MO	E	C
9	Mongrel	8	F	black	RF	5 <sup>th</sup>	Yes	L	5	S	R	C
10	Mongrel	14	M	black & tan	LF	2 <sup>nd</sup>	Yes	M	3	MO	M	C
11	Mongrel	8	MC	U	RF	3 <sup>rd</sup>		I	3	MI	E	C
12	Mongrel	13	FS	black	RH	U		M	10	MO	E	N
13	Mongrel	U	F	black	LF	U		L	36	MI	E	C
14	Mongrel	10	F	U	LF	2 <sup>nd</sup>	Yes	V	27	MO	E	C
15	Mongrel	11	M	black	RF	2 <sup>nd</sup>	Yes	V	57	MO	E	C
16	Mongrel	11	FS	black	RF	U		L	5	MO	S	C
17	Mongrel	12	MC	U	LH	U		V	3	MO	R	C
18	Mongrel	10	F	black	RF	3 <sup>rd</sup>		L	12	MI	S	C
19	Mongrel	11	FS	black	RH	U		L	9	S	E	C
20	Mongrel	10	M	U	RH	5 <sup>th</sup>		L	7	S	S	C
21	Mongrel	8	F	black	RF	3 <sup>rd</sup>		L	15	MI	R	C
22	Mongrel	15	M	black & tan	LH	5 <sup>th</sup>		L	15	MO	S	C
23	Mongrel	11	F	brown	RF	U		L	39	MO	S	C
24	Labrador Retriever	10	FS	yellow	RF	3 <sup>rd</sup>		L	5	MO	E	C
25	Labrador Retriever	12	M	brown	RH	4 <sup>th</sup>	Yes	L	13	S	E	C
26	Labrador Retriever	12	F	U	LF	3 <sup>rd</sup>	Yes	L	4	MO	S	I
27	Labrador Retriever	14	M	black	RF	3 <sup>rd</sup>		L	5	MO	E	C
28	Labrador Retriever	12	M	black	LH	5 <sup>th</sup>	Yes	L	9	MO	E	N
29	Labrador Retriever	8	M	black	RH	4 <sup>th</sup>		L	6	MO	E	C
30	Labrador Retriever	11	MC	yellow	LF	U		L	3	MI	B	C
31	Labrador Retriever	13	MC	black	LF	U	Yes	L	26	MI	S	C
32	Labrador Retriever	11	M	yellow	LH	U		L	10	MO	E	C
33	Labrador Retriever	10	F	U	RH	U	Yes	V	23	MO	S	C
34	Labrador Retriever	12	FS	black	RF	3 <sup>rd</sup>		V	13	MO	M	N
35	Labrador Retriever	12	M	U	RF	U		V	28	S	M	C
36	Labrador Retriever	12	M	brown	U	U	Yes	I	3	MI	E	C



37	Labrador Retriever	10	MC	brown	U	U		V	5	MO	R	C
38	Labrador Retriever	14	FS	brown	RF	2 <sup>nd</sup>		L	25	S	E	C
39	Giant Schnauzer	8	M	black	LF	5 <sup>th</sup>	Yes	M	3	MO	E	I
40	Giant Schnauzer	11	MC	black	RF	U		M	7	MO	M	I
41	Giant Schnauzer	9	M	black	RH	4 <sup>th</sup>		L	34	MO	E	C
42	Giant Schnauzer	10	MC	black	LF	3 <sup>rd</sup>	Yes	I	6	MO	E	I
43	Giant Schnauzer	14	M	black	U	U	Yes	V	21	S	E	C
44	Giant Schnauzer	10	MC	black	LF	2 <sup>nd</sup>		L	9	S	E	N
45	Giant Schnauzer	7	FS	black	RF	1 <sup>st</sup>		M	5	MO	E	C
46	Giant Schnauzer	5	M	black	LF	2 <sup>nd</sup>		V	15	MI	M	C
47	Giant Schnauzer	6	MC	black	RF	3 <sup>rd</sup>		L	34	MO	E	C
48	Giant Schnauzer	10	M	black	RH	5 <sup>th</sup>		M	2	S	E	C
49	Rottweiler	8	F	black & tan	RF	1 <sup>st</sup>		L	24	MO	E	I
50	Rottweiler	5	F	black & tan	U	U	Yes	L	65	S	E	C
51	Rottweiler	11	M	black & tan	LH	2 <sup>nd</sup>	Yes	L	15	S	E	C
52	Rottweiler	9	M	black & tan	RF	1 <sup>st</sup>		L	37	S	E	C
53	Rottweiler	6	F	black & tan	RF	2 <sup>nd</sup>		L	11	MO	S	C
54	Rottweiler	12	U	black & tan	LF	U		M	9	MO	E	C
55	Rottweiler	7	M	black & tan	RH	3 <sup>rd</sup>	Yes	L	5	S	E	N

56	Golden Retriever	8	M	yellow	RF	1 <sup>st</sup>		L	8	MO	E	C
57	Golden Retriever	6	FS	yellow	RF	3 <sup>rd</sup>		L	5	MO	M	C
58	Golden Retriever	12	F	yellow	LH	U		L	44	MO	M	C
59	Golden Retriever	15	FS	yellow	RF	5 <sup>th</sup>		L	7	MI	S	C
60	Irish Terrier	14	F	fawn	RF	U		V	34	MO	R	C
61	Irish Terrier	13	M	fawn	LF	U		L	3	S	E	C
62	Irish Terrier	11	MC	fawn	RF	2 <sup>nd</sup>		M	7	MO	M	N
63	Sheepdog	9	M	white	LF	U		V	9	S	R	C
64	Sheepdog	U	M	black	U	U	Yes	M	13	S	E	I
65	Sheepdog	11	FS	white	LH	4 <sup>th</sup>	Yes	L	28	MO	M	C
66	Bernese Mountain Dog	8	M	tricolour	LH	1 <sup>st</sup>		M	4	MO	S	C
67	Bernese Mountain Dog	11	FS	tricolour	RF	2 <sup>nd</sup>		L	5	S	E	C
68	Cocker Spaniel	11	FS	black	U	U		M	5	MO	S	C
69	Cocker Spaniel	12	FS	black	LF	3 <sup>rd</sup>		L	53	S	M	C
70	Poodle	11	M	yellow	RF	5 <sup>th</sup>		I	4	MO	M	C
71	Poodle	12	F	U	U	U		L	28	MI	S	C
72	Airedale Terrier	6	FS	black & tan	U	U		L	6	MI	S	C
73	Belgian	9	M	fawn	LH	4 <sup>th</sup>		L	13	MO	E	C

## Eigene Untersuchungen

	Shepherd											
74	Bullmastiff	10	F	fawn	LF	U		V	54	MO	E	N
75	Cairn Terrier	11	MC	U	LF	U		V	7	MO	E	C
76	Cane Corso	7	M	fawn	LH	5 <sup>th</sup>	Yes	M	9	S	E	C
77	Doberman	U	F	black & tan	LF	U		M	5	MO	M	C
78	French Bulldog	12	M	black	LF	4 <sup>th</sup>	Yes	L	15	S	E	C
79	German Hunting Terrier	13	MC	black & tan	LF	2 <sup>nd</sup>		L	7	MO	M	C
80	German Shepherd	8	M	U	RF	3 <sup>rd</sup>		M	31	S	M	C
81	Gordon Setter	13	M	black & tan	LF	5 <sup>th</sup>		L	5	MO	E	I
82	Havanese	15	M	black	LH	5 <sup>th</sup>		L	23	MO	R	C
83	Miniature Schnauzer	13	M	black	RF	1 <sup>st</sup>		L	7	MO	M	C
84	Pinscher	12	MC	black & tan	LF	2 <sup>nd</sup>		V	13	S	E	I
85	Scottish Terrier	10	FS	black	RH	1 <sup>st</sup>		M	7	MO	M	I
86	Tibetan Terrier	11	M	U	RF	3 <sup>rd</sup>	Yes	M	4	MO	E	C

U: unknown

### 3.2.2 Studie 2: Immunohistochemical and Molecular Genetic Analysis of Canine Digital Mast Cell Tumours

Conrad D., Kehl A., Müller T., Klopfleisch R., Aupperle-Lellbach H. (2023): Immunohistochemical and Molecular Genetic Analysis of Canine Digital Mast Cell Tumours. *Animals* 13 (10), 1694.

<https://doi.org/10.3390/ani13101694>

License: CC BY 4.0

## Article

# Immunohistochemical and Molecular Genetic Analysis of Canine Digital Mast Cell Tumours

David Conrad <sup>1,\*</sup>, Alexandra Kehl <sup>2,3</sup> , Tobias Müller <sup>4</sup> , Robert Klopfleisch <sup>5</sup> and Heike Aupperle-Lellbach <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology, Laboklin GmbH & Co. KG, 97688 Bad Kissingen, Germany; aupperle@laboklin.com

<sup>2</sup> Department of Comparative Experimental Pathology, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 München, Germany; kehl@laboklin.com

<sup>3</sup> Department of Molecular Biology, Laboklin GmbH & Co. KG, 97688 Bad Kissingen, Germany

<sup>4</sup> Department of Bioinformatics, University of Würzburg, 97074 Würzburg, Germany; tobias.mueller@uni-wuerzburg.de

<sup>5</sup> Institute of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany; robert.klopfleisch@fu-berlin.de

\* Correspondence: conrad@laboklin.com

**Simple Summary:** In veterinary medicine, methods such as histological grading, immunohistochemistry and mutation analysis of the *c-kit* gene are tools to assess the prognosis and treatment of canine cutaneous mast cell tumours. These methods have not yet been applied and evaluated on a large scale for mast cell tumours of the dog's toe, as these digital mast cell tumours are considered a subset of the cutaneous forms. Mast cell tumours can be more aggressive at certain sites. Therefore, the aim of this study was to apply these methods to 68 dogs with digital mast cell tumours. Even though only a few digital mast cell tumours were histologically poorly differentiated, more than half had immunohistochemical findings that could indicate an unfavourable prognosis. Mutations in the *c-kit* gene were found as well. Moreover, French Bulldogs—a breed that tends to develop benign variants at other sites on the skin—were more likely to have poorly differentiated tumours. Although outcome data were not available, the results of this study may contribute to a better understanding of canine mast cell tumours of the toe.



**Citation:** Conrad, D.; Kehl, A.; Müller, T.; Klopfleisch, R.; Aupperle-Lellbach, H. Immunohistochemical and Molecular Genetic Analysis of Canine Digital Mast Cell Tumours. *Animals* **2023**, *13*, 1694. <https://doi.org/10.3390/ani13101694>

Academic Editor: Marta Vascellari

Received: 12 March 2023

Revised: 17 May 2023

Accepted: 18 May 2023

Published: 19 May 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Grading, immunohistochemistry and *c-kit* mutation status are criteria for assessing the prognosis and therapeutic options of canine cutaneous mast cell tumours (MCTs). As a subset, canine digital MCTs have rarely been explored in this context. Therefore, in this retrospective study, 68 paraffin-embedded canine digital MCTs were analysed, and histological grading was assessed according to Patnaik and Kiupel. The immunohistochemical markers KIT and Ki67 were used, as well as polymerase chain reaction (PCR) for mutational screening in *c-kit* exons 8, 9, 11 and 14. Patnaik grading resulted in 22.1% grade I, 67.6% grade II and 10.3% grade III tumours. Some 86.8% of the digital MCTs were Kiupel low-grade. Aberrant KIT staining patterns II and III were found in 58.8%, and a count of more than 23 Ki67-positive cells in 52.3% of the cases. Both parameters were significantly associated with an internal tandem duplication (ITD) in *c-kit* exon 11 (12.7%). French Bulldogs, which tend to form well-differentiated cutaneous MCTs, had a higher proportion of digital high-grade MCTs and ITD in *c-kit* exon 11 compared with mongrels. Due to its retrospective nature, this study did not allow for an analysis of survival data. Nevertheless, it may contribute to the targeted characterisation of digital MCTs.

**Keywords:** dog; digit; toe; CD117; Ki67; KIT; grading; *c-kit*; PCR; sequencing

## 1. Introduction

Mast cell tumours (MCTs) represent up to 21% of all canine cutaneous tumours [1–5] and are generally characterised by very unpredictable biological behaviour [6]. For some dog breeds, predispositions have already been reported; Boxers [3,4,7,8], Golden and

Labrador Retrievers [3,4], French Bulldogs [3,4,7] and American Staffordshire Terriers [4] are often affected, whereas no gender predisposition could be identified [4,5]. The average age of dogs affected by MCTs is nine years [5], but they have also been described in dogs younger than one year of age [9].

Histological grading remains one of the cornerstones in the prognostic analysis of canine MCTs. The three-tier system developed by Patnaik and colleagues [8], in which tumours are classified into grades I to III, is still widely used. Unfortunately, a large number of MCTs are classified as grade II and are difficult to assess in terms of their biological behaviour, which weakens the prognostic value of this system [10]. In addition, interobserver variation has been reported [11]. Kiupel and colleagues [10] have addressed these problems, and subsequently developed a two-tier grading system that classifies tumours as low- or high-grade. The latter system has proven to be more prognostically significant, and is often used in addition to the Patnaik system [12].

There are various immunohistochemical markers used in canine MCTs. In this context, a meta-analysis by Freytag et al. [13] identified Ki67 and KIT as having prognostic value. Ki67 is a protein originally discovered in human research, whose cellular expression is closely related to the cell cycle. It is not found in cells that are in the resting phase, making Ki67 a suitable marker for mitotically active cells [14] and also a prognostic factor for canine MCT [13]. The receptor tyrosine kinase KIT (CD117) is a membrane-bound receptor that interacts with its ligand stem cell factor (SCF), and is not only located on mast cells, but also on the surface of many other cell types such as haematopoietic stem cells, interstitial cells of Cajal, melanocytes and germ cells; it plays an important role in the survival and differentiation of these cells, as summarised by Esteban-Villarrubia et al. [15]. Mast cells can show aberrant immunohistochemical patterns of KIT expression, e.g., a perinuclear pattern (pattern II) and a diffuse intracytoplasmic pattern (pattern III) [16]. The two aberrant patterns are correlated with increased cell proliferation and a higher histological grade of canine MCT [17].

The proto-oncogene *c-kit* encodes for the receptor tyrosine kinase KIT [15]. Imatinib, masitinib and toceranib are examples of receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKI) that can inhibit KIT on an intracellular level [18]. In some cases, they can achieve higher response rates if a *c-kit* mutation is present [19,20]. However, imatinib was developed for treating human chronic myelogenous leukaemia [18] and is not approved for cancer treatment in small animals. According to the European Medicines Agency (EMA), the use of masitinib (Masivet<sup>®</sup>) is indicated if a *c-kit* mutation has been proven (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/masivet>, accessed on 16 February 2023), which requires genetic testing for *c-kit* mutations before starting treatment. This restriction does not apply to toceranib (Palladia<sup>®</sup>), as according to the EMA marketing authorisation, the detection of a *c-kit* mutation is not mentioned (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/palladia>, accessed on 3 May 2023).

Mutations of the *c-kit* gene were found in a variety of canine cutaneous MCTs, with these variants most frequently occurring in exon 11, and less frequently in exons 8, 9 and 14 [21–25]. In a study including 221 cutaneous MCTs, internal tandem duplications (ITDs) in exon 8 were associated with longer total survival [26]. Mutations in exon 9 seem to be involved in the development of resistance to the RTKI masitinib in cutaneous MCT [27]. It is interesting to note that in one study, Nakano and colleagues [25] reported on a canine MCT carrying a secondary mutation in exon 14, which was thought to be responsible for imatinib resistance.

ITDs in exon 11 were found in up to 50% of canine cutaneous MCTs, and correlate with higher grading [28,29], higher cellular proliferation activity [30], higher risk of metastasis at the time of surgery [29], and decreased survival times [21,26].

Commonly reported sites of cutaneous MCTs include the limbs, head and trunk [31,32]. These sites have often been the subject of research, whereas MCTs of the digit have barely been studied separately. Yet, up to 78% of all neoplastic processes on the toe are malignant tumours, and 4.3 to 10.5% of these are MCTs [33–35]. It has been observed that MCTs at

certain locations such as mucocutaneous junctions or the inguinal region have a poorer prognosis than MCTs at other body sites [5,6]. This could also be related to the fact that tumours at these sites are difficult to resect with clean margins [5].

The aim of this study was to characterise canine digital MCTs with respect to their histological grading, immunohistochemical KIT patterns and proliferation activity (Ki67), as well as their *c-kit* mutations.

## 2. Materials and Methods

In this retrospective study, 68 MCTs of the canine digit were used, which were submitted for routine diagnostics between 2014 and 2022 to Laboklin GmbH & Co. KG, Bad Kissingen, Germany. In all cases, the initial diagnosis “mast cell tumour of the digit” had been made by a trained veterinary pathologist.

The inclusion criteria were that the MCT was of dermal origin, localised to the toe, and a paraffin-embedded tumour block was available prior to decalcification, because of its further use for immunohistochemistry (IHC) and DNA isolation. In addition, all cases that contained tumours of subcutaneous origin were excluded from the study.

Age, gender, breed and further information, if available, were collected. For additional information, the veterinarians were contacted by telephone. The exact site of the digital mass and a short report of the clinical course were documented whenever possible. The size of the tumour was either documented before cutting or, if this was not clearly visible, the diameter of the tumour was measured on the digitised specimen.

As all samples were submitted for routine diagnostic purposes and, moreover, were no longer needed for diagnostics, it was not required that we submit an animal testing request or obtain an ethics committee’s approval. This approach is supported by the decision of the local government (RUF-55.2.2-2532-1-86-5).

### 2.1. Histopathology

Toes were trimmed routinely as previously described [36]. One non-decalcified tumour site from each toe was used for further IHC and genetic analysis of mutations in *c-kit* exons 8, 9, 11 and 14. Sections were stained with haematoxylin and eosin (HE) and histologically evaluated by a trained veterinary pathologist as part of routine diagnostic procedures, and re-evaluated by H.A.L. and D.C.

Histological grading was carried out according to the known schemes of Patnaik et al. [8] into grade I–III, as well as into low- and high-grade according to Kiupel et al. [10]. Evaluation of histological tumour margins and analyses that included cell counting, such as mitotic count/1 or 10 high-power fields (HPF), cells with three or more nuclei/10 HPF, cells with bizarre nuclei/10 HPF and karyomegaly, were performed on digitised slides. For this purpose, the HE-stained sections were scanned with an Aperio AT2 Scanner (Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA), digitised, and evaluated using the Aperio ImageScope software (v12.4.3.5008; Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA). The area of 10 HPF was defined as 2.37 mm<sup>2</sup>, as described by Meuten et al. [37], and digitally plotted within the area of highest mitotic activity. As there is no standard classification for the histological assessment of MCT margins [38], we recorded the distance between tumour cells and healthy tissue at the narrowest point, and defined the tumour margins similarly to the work of Karbe et al. [39] as follows: clean (>3 mm), narrow (<3 mm), and infiltrated by tumour cells (<1 mm).

Due to the retrospective nature of this study, there was a lack of corresponding lymph node tissue in the individual cases. It was also not possible to determine whether the individual dogs were affected by solitary or multiple mast cell tumours, or if metastases were present. Clinical staging according to WHO recommendations was therefore not feasible.

### 2.2. Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, 2 µm-thin sections of each formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue were mounted on coated slides (SuperFrost® Plus, Menzel Gläser,

Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After drying overnight at 58 °C, these sections were subjected to immunohistochemistry for analysis of KIT expression pattern and Ki67 expression. Pre-treatment for antigen demasking was performed at 96 °C with EDTA buffer (HIER T-EDTA, pH 9.0, Zytomed #ZUC029-500, Zytomed System GmbH, Berlin, Germany) in a commercial steam heater for 25 min. Primary antibodies (Table 1) known to cross-react with canine tissue were diluted in antibody dilution (#ZUC025-100, Zytomed System GmbH, Berlin, Germany) and applied on cover plates (Shandon Coverplate™, #A73310024, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK). Positive controls were canine cutaneous basal cells (KIT) and canine lymph node tissue (Ki67). The sections were incubated with the primary antibodies at room temperature for 60 min, and the primary antibody was replaced with buffer for the negative controls. This was followed by the application of an enhancement reagent for 20 min and the application of an HRP polymer for 30 min, both at room temperature. Both reagents are components of a commercially available detection system (ZytoChem Plus HRP Polymer Kit, #POLHRP-100, Zytomed System GmbH, Berlin, Germany). Finally, the slides were incubated at room temperature for 10 min with a DAB (3,3'-diaminobenzidine) chromogen (#K3468, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark), and counterstaining was performed with Mayer's haematoxylin.

**Table 1.** Primary antibodies and pre-treatment used for immunohistochemistry.

Antigen	Species	Supplier	Dilution	Pre-Treatment
KIT/CD117	rabbit	Dako <sup>1</sup> (#A4502)	1:150	EDTA buffer
Ki67	mouse	Dako <sup>1</sup> (#M7240)	1:200	EDTA buffer

<sup>1</sup> Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark.

The KIT staining pattern was divided into the following three classes: pattern I, membrane-associated, pattern II, focal to stippled cytoplasmic, and pattern III, diffusely cytoplasmic [17]. The two cytoplasmic patterns II and III are summarised hereafter as aberrant patterns, according to Freytag et al. [13].

Evaluation of the Ki67-positive cells was carried out as already described by Webster et al. [30]. However, the analysis was also performed on digitised preparations. According to our calculations, the 1 cm<sup>2</sup> grid area used by Webster et al. at 400 × magnification corresponds to an area of 250 × 250 µm in the digital field. Of these areas, five were placed in sections of high proliferative activity, the Ki67-positive cells in each field were digitally labelled, and the mean value of the sum was calculated.

### 2.3. Screening for Mutations in Exons 8, 9, 11 and 14 of *c-kit*

From the paraffin-embedded samples, 2 µm-thin layers of tumour tissue were removed with a microtome and then processed directly for DNA extraction, first using a QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and subsequently a Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, Freiburg, Germany), according to the manufacturer's instructions. The sequences of exons 8, 9, 11 and 14 of *c-kit* were analysed using PCR amplification followed by Sanger sequencing. Primers are listed in Table 2. Bidirectional Sanger sequencing of all PCR products was performed on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using a BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to standard protocols. Sequencing files were analysed using Sequence Scanner software (version 2; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

**Table 2.** Primer sequences used for the analysis of *c-kit* exons 8, 9, 11 and 14.

<i>c-kit</i> Exon	Primer	Sequence
8	Forward	5'-GGT GAG GTG TTC CAG CAG TC-3'
	Reverse	5'-CCT TCC CTC GTG CAC ATT A-3'
9	Forward	5'-ACT CGT CTC TGT CAC CGT CTG GAA-3'
	Reverse	5'-ATG GCA GGC AGA GCC TAA ACA TCC-3'
11	Forward	5'-CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAG-3'
	Reverse	5'-GTT CCC TAA AGT CAT TGT TAC ACG-3'
14	Forward	5'-AGC CTG CTA AGT ATT TGC CTT ATC AAT-3'
	Reverse	5'-TGG CAC CTC GAA GTA CCT CTG T-3'

#### 2.4. Statistical Analysis

Statistical significance analyses were evaluated using IBM SPSS Statistics (version 29, IBM, Armonk, NY, USA). Using the Kruskal–Wallis test, Patnaik grading results were compared with the following parameters: mitotic figures (for statistical purposes within 10 HPF), Ki67 count (more or less than 23 positive cells per grid area), and KIT pattern (physiological versus aberrant). The results of the Kiupel grading were compared with the same parameters using the Mann–Whitney-U (MWU) test.

Likewise, the impact of ITD in *c-kit* exon 11 on Patnaik grading and mitotic figures/10 HPF was analysed using the MWU test. For comparing ITD in *c-kit* exon 11 and the remaining binary codable variables (Kiupel grading, Ki67 count and KIT pattern), Fisher's exact test was applied.

The Ki67 and KIT pattern were compared to each other using the MWU test and a Benjamini–Hochberg multiple testing correction, as implemented in the statistical framework R version 4.2.2 [40].

Finally, Firth's bias-reduced penalized-likelihood logistic regression was applied as implemented in the R package "logistf" [41] to compare the results of the Kiupel grading with the clinical data (gender, castration, tumour size and age), KIT pattern, Ki67 count and ITD in *c-kit* exon 11. To start with, the full model that includes all covariates is used. Then, the ideal model is selected by a backward model selection procedure based on a penalised likelihood ratio test, as implemented in the logistf R package. Since the Patnaik factor is an ordered categorical variable with three levels (grade I–III), a generalisation of the typical logistic regression had to be applied. An "ordered logistic regression" was used here as implemented in the "polr" function in the R package MASS [42]. As with the Kiupel grading, at first, the full model is used and then a backward model selection procedure is applied, this time based on the Bayesian information criterion (BIC).

### 3. Results

#### 3.1. Case Description

The age of the 68 dogs that were included in this study ranged from 2 to 15 years, with a median age of 8 years. In one case, the age was unknown (Table S1). Some 35 animals were male (24 intact, 11 castrated), and 33 animals were female (21 intact, 12 spayed). The following breeds were represented: 13 mongrels, 7 French Bulldogs, 7 Labrador Retrievers, 6 Boxers, 6 Golden Retrievers, 5 Pugs, 2 Bernese Mountain Dogs, 2 German Shepherds, and 2 Yorkshire Terriers. There was only one animal of each of the following breeds: American Staffordshire Terrier, Beagle, Border Collie, Boston Terrier, Bracke, Briard, Bullmastiff, Chihuahua, Cocker Spaniel, Coton de Tuléar, Dogo Argentino, English Toy Terrier, Havanese, Jack Russell Terrier, Maltese, Munsterlander, Puli, and Siberian Husky.

MCT affected the forelimb ( $n = 35$ ) more often than the hindlimb ( $n = 19$ ). In 14 cases, this information was not available. Telephone enquiries were made to record the further course and the current health status of the animals. We also asked whether alternative or additional therapies (especially the use of receptor tyrosine kinase inhibitors) were carried out in addition to toe amputation, in order to be able to analyse the correlation between the



presence of *c-kit* mutations and a successful or failed treatment. However, it turned out that this information was no longer available in the majority of cases. The reason for this was that due to the retrospective nature of this study, some of the cases dated back to 2014, and the relevant information was no longer available in the records of the clinicians contacted. In addition, the animals were often only presented to the clinicians for toe amputation, and were afterwards treated elsewhere. We therefore decided not to statistically investigate survival times and the influence of mutations in *c-kit* on therapeutic success, in order to avoid generating non-valid data.

### 3.2. Grading and Pathological Findings

The size of the tumours varied in diameter from 0.2 cm to 7.0 cm (median: 2.5 cm). Margins were clean in 29 cases, narrow in 6 cases, and in 33 cases, the margins were infiltrated by tumour cells. An example of the macroscopic appearance is given in Figure 1a.

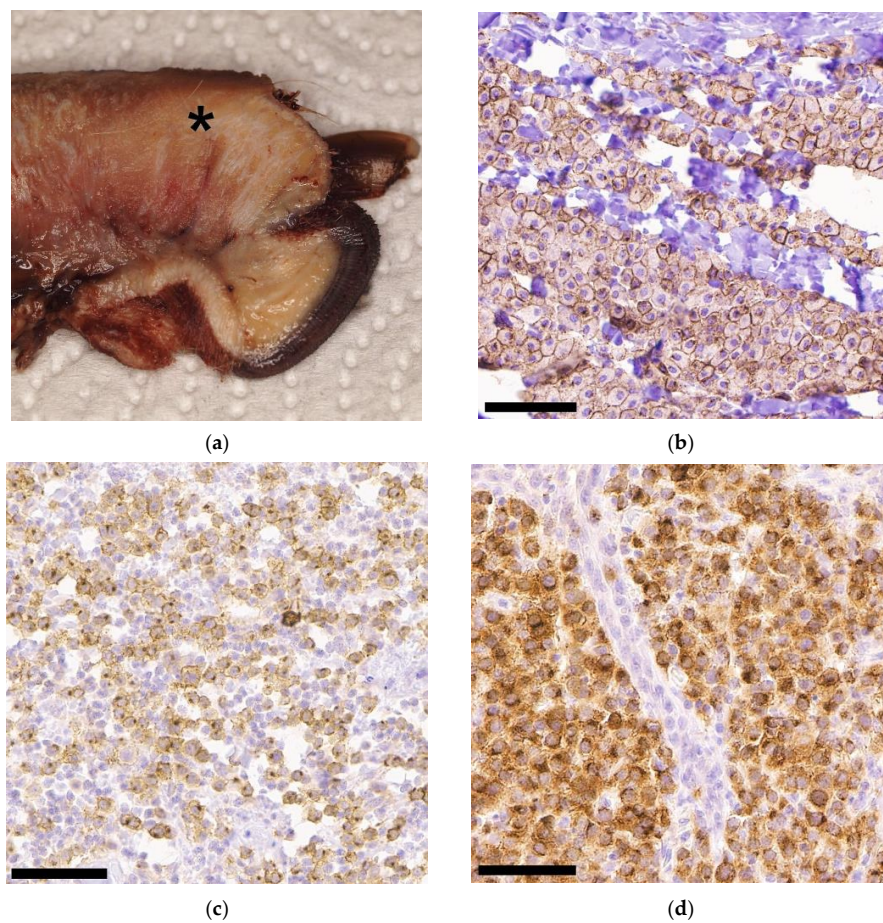
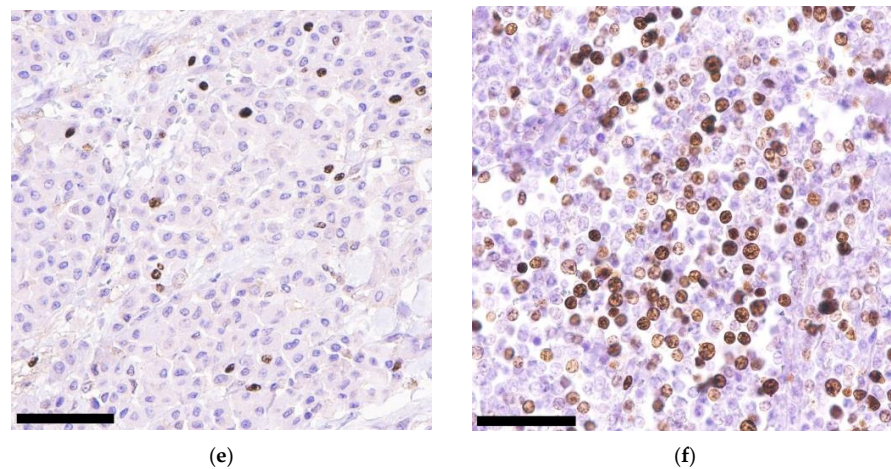


Figure 1. Cont.



**Figure 1.** Macroscopic (a) and immunohistochemical ((b–f); bar = 60 µm) findings in different digital mast cell tumours from this study: (a) Longitudinal cut of a formalin-fixed amputated digit with a mass (asterisk) originating from the cutis and extending downwards; (b) KIT pattern I showing membrane-associated staining; (c) KIT pattern II with distinctive perinuclear staining; (d) KIT pattern III showing diffuse cytoplasmic staining; (e) Ki67 staining with less than 23 Ki67-positive cells per grid area; (f) Ki67 staining with more than 23 Ki67-positive cells per grid area.

The analysis based on the three-tier system of Patnaik and colleagues [8] resulted in the following: 15 × grade I (22.1%), 46 × grade II (67.6%) and 7 × grade III (10.3%). All cases were additionally graded according to the two-tier system of Kiupel and colleagues [10]. Some 59 cases (86.8%) were categorised as low-grade tumours, and 9 cases (13.2%) were high-grade tumours. All Patnaik grade I tumours were Kiupel low-grade, and all Patnaik grade III tumours were Kiupel high-grade. Of the 46 cases classified as Patnaik grade II, 44 cases (95.7%) were Kiupel low-grade tumours, and 2 cases (4.3%) were Kiupel high-grade tumours. In the Patnaik grading system, mitotic figures/HPF ranged from 0 to 4 (median: 1). For the Kiupel grading system and the statistical analysis, the mitotic figures/10 HPF were recorded. They ranged from 0 to 9 (median: 1).

Logistic regression models could not find any statistically significant relationship between the two grading systems with regard to gender, castration, tumour size and age. However, a high mitotic count was significantly associated with higher grading in both the Patnaik ( $p < 0.001$ ) and the Kiupel ( $p < 0.001$ ) grading systems.

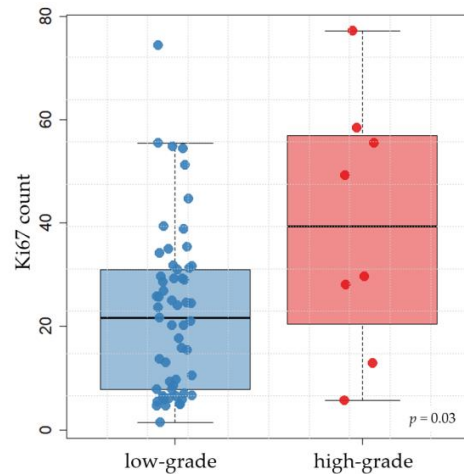
### 3.3. Immunohistochemical KIT and Ki67 Expression

The distribution of the KIT staining pattern was as follows: 28 × staining pattern I (membrane-associated; 41.2%; Figure 1b), 9 × pattern II (focal to stippled cytoplasmic; 13.2%; Figure 1c), and 31 × pattern III (diffuse cytoplasmic; 45.6%; Figure 1d).

The Ki67 count was determined in 65 cases; in 3 cases, it was not possible to obtain any evaluable staining, despite repeating the process several times. The average count of Ki67-positive cells from five fields of 250 × 250 µm each ranged from 1.4 to 77.2 (median: 24.0). In this study, 34/65 tumours (52.3%) were above the threshold (more than 23 Ki67-positive cells per grid area), of which 6 (17.6%) were Patnaik grade I. Some 23 tumours (67.7%) were grade II (22 Kiupel low-grade, 1 Kiupel high-grade), and the remaining 5 (14.7%) were grade III. Two examples of Ki67 staining are shown in Figure 1e,f.

Statistical analysis showed that the Ki67 count and KIT pattern had no statistically significant association with each other and, furthermore, both variables were not associated with Patnaik or Kiupel grading. The logistic regression compared a variety of factors (see Section 2.4) with the two grading systems. In both cases, the model selected only one factor: ITD in *c-kit* exon 11 (both  $p < 0.001$ ). We omitted this significant factor and recalculated

the model. We obtained a significant ( $p = 0.027$ ) association between Patnaik grading and immunohistochemical KIT pattern. We also found a significant ( $p = 0.03$ ) relationship between Kiupel grading and Ki67 count (Figure 2).



**Figure 2.** Distribution of Ki67-positive cells (average of five fields, each  $250 \times 250 \mu\text{m}$ ) on the  $y$ -axis, within the Kiupel two-tier system on the  $x$ -axis. The association between the two parameters was statistically significant ( $p = 0.03$ ).

### 3.4. *c-kit* Mutation Status

In total, the *c-kit* mutation status of exons 8, 9, 11 and 14 was investigated in 68 dogs ( $n = 272$  PCR approaches). In 233/272 cases (85.7%), amplification was successful and the corresponding product was sequenced. As far as the individual exons are concerned, the following number of cases could be sequenced:  $n = 53$  for exon 8;  $n = 64$  for exon 9;  $n = 63$  for exon 11; and  $n = 53$  for exon 14.

In the 53 tumours screened for *c-kit* exon 8 variants, neither ITDs nor any other mutations were found; all cases showed the sequence that corresponds to the wild type. The 64 cases examined for *c-kit* exon 9 mutations were all wild-type.

One case with a mutation was found in exon 14 with a G > A transversion (c.2020G > A), which causes an exchange of the amino acid glutamic acid to lysine. The tumour containing this mutation had no mutations in the other exons examined. The outcome data were not available.

ITDs in *c-kit* exon 11 were found in 8/63 tumours (12.7%). In addition, in two cases, a single nucleotide polymorphism (SNP) was found in exon 11, which is also listed as such in the ENSEMBL gene database (SNP No.: rs853024368; <https://www.ensembl.org/index.html>, accessed on 23 January 2023). This is a silent polymorphism, as the amino acid tyrosine is retained despite the base exchange of C > T. Another SNP, consisting of a T > C base exchange, was found in 16/63 cases (25.4%) in the adjacent intron 11; this has already been described in the literature, and also has no effect on the constitution of the protein as it is located in the non-coding intron [43]. Graphical information on the results of grading, immunohistochemistry (KIT), and screening for ITD in *c-kit* exon 11 are summarised in Figure 3.

	Patnaik	Kiupel	KIT Pattern	ITD <i>c-kit</i> exon 11
68 canine digital MCTs	Grade I 15/68	Low-grade 15/15	I: 10/15	0/9 <sup>#</sup>
			II: 2/15	0/2
			III: 3/15	0/3
	Grade II 46/68	Low-grade 44/46	I: 17/44	0/15 <sup>†</sup>
			II: 5/44	1/5
		High-grade 2/46	III: 22/44	2/20 <sup>†</sup>
			III: 2/2	1/2
	Grade III 7/68	High-grade 7/7	I: 1/7	0/1
			II: 2/7	2/2
III: 4/7			2/4	
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>68</b>	<b>68</b>	<b>63</b>

**Figure 3.** Summary of grading, immunohistochemistry (KIT) and screening for ITD in *c-kit* exon 11. Abbreviations and notes: MCTs, mast cell tumours; <sup>#</sup>, PCR failed  $n = 1$ ; <sup>†</sup>, PCR failed  $n = 2$ .

The statistical analysis examined whether the presence of mutations in *c-kit* was associated with the characteristics of the histological factors (grading according to Kiupel and Patnaik, as well as mitotic count) and the immunohistochemical results (KIT pattern and Ki67 count). The analysis was limited to *c-kit* exon 11, because no mutation was found in *c-kit* exons 8 and 9, and only one mutation was found in *c-kit* exon 14, which was considered insufficient for statistical significance.

MCTs with an ITD in *c-kit* exon 11 were significantly ( $p = 0.002$ ) associated with a higher Patnaik grading (grade II/III) compared with Patnaik grade I. Furthermore, the relationship between the presence of an ITD in *c-kit* exon 11 and the classification of the tumour as Kiupel high-grade was significant ( $p < 0.001$ ). The majority of tumours without an ITD in *c-kit* exon 11 were classified as Kiupel low-grade (51/55; 92.7%). More than half (5/8; 62.5%) of the eight tumours with an ITD in *c-kit* exon 11 were Kiupel high-grade, but the remaining three (all Patnaik grade II) were Kiupel low-grade. ITDs in *c-kit* exon 11 were also associated with a generally increased mitotic count ( $p < 0.001$ ) and a Ki67 count above the threshold of 23 positive cells per grid area ( $p = 0.006$ ). Furthermore, data showed that tumours with an ITD in *c-kit* exon 11 tended to have an aberrant KIT pattern ( $p = 0.018$ ). The  $p$ -values are summarised in Table 3.

**Table 3.** Significant relationships between internal tandem duplication (ITD) in *c-kit* exon 11 and histological/immunohistochemical parameters.

Parameter	ITD <i>c-kit</i> Exon 11
Patnaik grading	$p = 0.002$
Kiupel grading	$p < 0.001$
Mitotic count	$p < 0.001$
Ki67 count	$p = 0.006$
KIT pattern	$p = 0.018$

The most common purebred dogs in this study were French Bulldogs, Boxers, Retrievers and Pugs. Among the mixed breeds, the proportion of high-grade MCTs (1/13; 7.7%) and ITD in *c-kit* exon 11 (2/12; 16.7%) was low. Retrievers and Pugs all had low-grade tumours and no ITD in *c-kit* exon 11. One in six Boxers (16.7%) had a high-grade MCT, but none of them had an ITD in *c-kit* exon 11. Unexpectedly, French Bulldogs were more frequently affected by high-grade MCTs (4/7; 57.1%) and ITD in *c-kit* exon 11 (3/7; 42.8%) compared with mongrels.



#### 4. Discussion

The aim of this study was to examine canine digital MCTs histologically (with Patnaik and Kiupel grading) and immunohistochemically (with KIT pattern and Ki67 count) on a larger scale, and to provide an overview of *c-kit* mutation status.

Digital MCTs are a subset of cutaneous MCTs. Studies that have investigated canine MCT in the past often did not differentiate between the exact anatomical location, and it can therefore not be excluded that digital MCTs were not part of these studies. When the tumour site was reported, it was often limited to the limb in general [4,7,22,29,32,44–46]. Thus, no conclusions could be drawn as to whether MCTs of the digit were part of the study material. A direct comparison of the data is therefore not possible. However, it was attempted at certain points of this study in order to be able to place the study results of digital MCTs in the overall context of cutaneous MCTs.

Breeds that seem to have a predisposition to developing cutaneous MCTs have already been identified [3,4,7,8], and some of them, such as French Bulldogs, Boxers, Retrievers and Pugs, were also represented in this study. A study by Śmiech et al. [4] found that French Bulldogs, Golden and Labrador Retrievers and Boxers were more likely to develop low-grade MCTs. In Golden and Labrador Retrievers, germline variants in the *DSCAM* gene have been reported, which could be responsible for the fact that these two breeds are frequently affected by the development of MCTs [47]. Pugs, too, have been described as being more prone to developing low-grade MCTs [45]. For Retrievers, Boxers and Pug Dogs, our results are in agreement. However, our findings differed from the aforementioned study by Śmiech et al. regarding French Bulldogs, as in our study of digital MCT, they were more likely to develop high-grade MCTs. Additionally, there was a higher occurrence of ITDs in *c-kit* exon 11 in this breed than in mongrels. This could indicate that French Bulldogs are a breed in which the location of MCTs at the digit plays a special role, as they had an increased proportion of poorly differentiated MCTs according to our results. Thus, *c-kit* mutation analysis, in addition to histological grading, could be particularly useful in identifying poorly differentiated MCTs in French Bulldogs. It should be mentioned that the majority of tumours investigated in this study were from German dogs. French Bulldogs are a popular dog breed in Germany, which has been confirmed by other studies analysing data from a German animal registration portal [3,35]. The number of French Bulldogs in our study population thus reflects the breed distribution in Germany. The proportion of certain dog breeds, such as French Bulldogs, in the total animal population may therefore vary between different regions and countries.

The majority (67.6%) of the digital MCTs examined in this study were Patnaik grade II. This is consistent with what was observed by colleagues who graded cutaneous MCTs from different sites and also found Patnaik grade II to be the most common grade, ranging from 43% to 75% [8,46,48,49]. Most (86.8%) of the digital MCTs corresponded to Kiupel low-grade. All Patnaik grade I tumours were Kiupel low-grade, and all Patnaik grade III tumours were Kiupel high-grade, while for Patnaik grade II, the majority (95.7%) could be classified as Kiupel low-grade tumours. A review by Avallone et al. [12] described similar ratios of the two grading systems when applied to cutaneous MCTs in general. We therefore conclude that the ratios found in the histological grading of digital MCTs, as a subset of cutaneous MCTs, are comparable to the data shown in the literature for cutaneous MCTs.

In the prognostic assessment of canine MCT, the two immunohistochemical markers Ki67 and KIT are frequently used. They were also recommended in a recent consensus article [50], and were used in our study on digital MCT. A meta-analysis by Freytag et al. [13] confirmed the prognostic value of Ki67 and KIT, and confirmed the legitimacy of these immunohistochemical markers for use in routine diagnostics. In their meta-analysis, the colleagues also identified the protein BAX, which is involved in apoptosis, as an immunohistochemical marker that could be used in the future in MCTs, as it has promising prognostic value [13]. Thamm et al. [51] investigated phosphorylated KIT (pKIT) and found that its immunohistochemical expression is a predictor of the biological behaviour of cutaneous MCTs. However, the authors also emphasised that further studies

are needed before a recommendation can be made for the use of pKIT in routine diagnostics. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the argyrophilic nucleolar organizing region (AgNOR) are proliferation markers that have been investigated by Webster et al. [30], in addition to Ki67, for their independent prognostic significance. The routine use of AgNOR and Ki67 was recommended to accompany histological grading, *c-kit* mutation analysis and KIT immunohistochemistry in order to assess the progression of canine MCT [30].

It can be found in the literature on cutaneous MCTs that an aberrant immunohistochemical staining pattern of the KIT receptor [16], an increased Ki67 count of more than 23 Ki67-positive cells per grid area [30], and a high mitotic count [52] correlate with a higher histological grade. In our study, although most of the MCTs were prognostically favourable according to the grading, more than half of the tumours (52.3%) had a Ki67 count of more than 23 positive cells per grid area, a limit defined by Webster et al. [30] for cutaneous MCTs. In addition, well over half of the cases (58.8%) had an aberrant KIT pattern. Even though the statistical analysis did not show a significant relationship between KIT pattern and Ki67 count, logistic regression models demonstrated a statistical significance between Patnaik grading and KIT pattern ( $p = 0.027$ ), and between Kiupel grading and Ki67 count ( $p = 0.03$ ). Furthermore, there was a significant association ( $p < 0.001$ ) between a high mitotic count and a higher grading (in both systems). The large proportion of tumours in our study with aberrant KIT patterns and Ki67 counts above the threshold were an unexpected finding, and suggest that despite the fact that many of the tumours were histological low-grade tumours, digital MCT might be prognostically unfavourable. This retrospective study could not provide a meaningful outcome analysis, and future prospective studies will be necessary to evaluate the prognostic significance of KIT and Ki67 immunohistochemistry in digital MCT.

Some 8 of the 63 cases (12.7%) were found to have an ITD in *c-kit* exon 11. The additional identification of two different types of SNP in exon and intron 11 shows that, concerning its results, the methodology was robust. ITDs in *c-kit* exon 11 were found in tumours that generally had a higher Patnaik ( $p = 0.002$ ) and Kiupel ( $p < 0.001$ ) grading, a higher mitotic count ( $p < 0.001$ ), an increased number of Ki67-positive cells ( $p = 0.006$ ), and an aberrant KIT pattern ( $p = 0.018$ ). It should be mentioned here, however, that the connection between *c-kit* mutations and aberrant expression of KIT is not as clear as it appears, as they seem to be independent processes [53]. The present data confirm that ITDs in *c-kit* exon 11 may be a tool for identifying histologically aggressive canine digital MCT.

No mutations were found in *c-kit* exon 8. Mutations located in this exon, mainly ITDs, have been described in cutaneous MCT as being associated with a more favourable prognosis [26]. In a recent study by Chen et al. [54] on 216 subcutaneous MCTs, 10.6% of cases were identified as carrying a *c-kit* exon 8 ITD, and only 5.6% of cases were found to have an ITD in exon 11, a ratio that is the inverse of what has been described for cutaneous forms. The authors concluded that subcutaneous MCTs tend to be characterised by a less aggressive biological behaviour than the cutaneous MCTs. Overall, mutations in *c-kit* exon 8 in digital MCT, being associated with a potentially better prognosis, seem to play a minor role, as they could not be found in our study.

No mutations were found in *c-kit* exon 9 of digital MCTs. Since mutations in this exon are discussed as being partly responsible for the development of resistance to the RTKI masitinib [27], it was in our interest to quantify them in digital MCTs. They are rather rare in cutaneous MCTs [22,24], and were absent in our study population of digital MCTs.

A single point mutation was found in *c-kit* exon 14. Mutations in this exon are also rare in cutaneous MCT; however, there is one case in which a deletion in *c-kit* exon 11 was found in a lymph node metastasis of a canine MCT, in addition to a second mutation in *c-kit* exon 14 [25]. The colleagues demonstrated that this second mutation in exon 14 caused resistance to the RTKI imatinib in vitro. This gave us the incentive to include exon 14 in our investigations. However, our case with a point mutation in exon 14 showed wild-type sequences in the other exons, and the further clinical course was unknown.

Concerning the aim of this study, it was possible to extensively examine the digital MCTs histologically and immunohistochemically, and to detect their *c-kit* mutation status. Unexpectedly, many digital MCTs had an aberrant immunohistochemical KIT pattern and were highly proliferative, despite a large proportion of low-grade tumours. In certain breeds, such as French Bulldogs, it may be particularly useful to consider the anatomical location of the MCT in a differentiated way, as the digits of this breed may more often have poorly differentiated MCTs. What remains is the lack of outcome analyses that could have further investigated the prognostic significance of grading, immunohistochemical KIT patterns, Ki67 activity and *c-kit* status. The limitations of this study arose from its retrospective nature. Under these circumstances, it was also not possible to differentiate whether the animals were affected by solitary or multiple MCTs, and if metastases occurred. A possible approach for future prospective studies would be to compare digital MCTs with a group of distinctly non-digital MCTs, in order to make reliable statements about the extent to which digital MCTs differ from those at other sites. This could further contribute to our understanding of this tumour site.

## 5. Conclusions

In summary, only a few of the digital MCTs were histologically poorly differentiated (Patnaik grade III or Kiupel high-grade). Nevertheless, it is remarkable that a high proportion of tumours had aberrant KIT patterns II and III, and many digital MCTs also had increased proliferation activity, as detected by Ki67. In addition to histological grading, testing for ITD in *c-kit* exon 11 in digital MCTs might be useful for identifying aggressive tumours, especially in French Bulldogs, as a statistically significant association with higher grading, an aberrant KIT pattern and an increased Ki67 count could be found.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani13101694/s1>, Table S1: Mutational analysis, histological and immunohistochemical findings and case description of dogs with digital mast cell tumours ( $n = 68$ ).

**Author Contributions:** Conceptualization, R.K. and H.A.-L.; Data curation, D.C., A.K. and T.M.; Formal analysis, D.C., A.K., T.M. and R.K.; Funding acquisition, H.A.-L.; Investigation, D.C., A.K. and H.A.-L.; Methodology, D.C. and A.K.; Project administration, H.A.-L.; Resources, H.A.-L.; Supervision, H.A.-L.; Validation, A.K. and H.A.-L.; Writing—original draft, D.C.; Writing—review and editing, A.K., R.K. and H.A.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by BAYERISCHE Forschungsstiftung, grant number AZ-1365-18, within the Forschungsverbund Tumordiagnostik für individualisierte Therapie–FORTiTher, TP-4 (D.C., A.K. and H.A.-L.).

**Institutional Review Board Statement:** Ethical review and approval were waived for this study due to submission of the samples as part of routine diagnostics to Laboklin GmbH & Co. KG. Supporting legal basis: RUF-55.2.2-2532-1-86-5.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are available upon request due to privacy/ethical restrictions.

**Acknowledgments:** We would like to thank Doreen Girndt for the linguistic revision. We would also like to thank the pathology and genetic laboratory technicians at Laboklin GmbH & Co. KG for their support in the immunohistochemical and genetic work-up of the cases.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. David Conrad, Alexandra Kehl, Robert Klopfeisch and Heike Aupperle-Lellbach do offer diagnostic, genetic and pathology services.

## References

1. Bostock, D.E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br. Vet. J.* **1986**, *142*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tamlin, V.S.; Bottema, C.D.K.; Peaston, A.E. Comparative aspects of mast cell neoplasia in animals and the role of KIT in prognosis and treatment. *Vet. Med. Sci.* **2020**, *6*, 3–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Aupperle-Lellbach, H.; Grassinger, J.M.; Floren, A.; Törner, K.; Beitzinger, C.; Loesenbeck, G.; Müller, T. Tumour Incidence in Dogs in Germany: A Retrospective Analysis of 109,616 Histopathological Diagnoses (2014–2019). *J. Comp. Pathol.* **2022**, *198*, 33–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Śmiech, A.; Lopuszyński, W.; Ślaska, B.; Bulak, K.; Jasik, A. Occurrence and Distribution of Canine Cutaneous Mast Cell Tumour Characteristics Among Predisposed Breeds. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 141–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Blackwood, L.; Murphy, S.; Buracco, P.; de Vos, J.P.; de Fornel-Thibaud, P.; Hirschberger, J.; Kessler, M.; Pastor, J.; Ponce, F.; Savary-Bataille, K.; et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet. Comp. Oncol.* **2012**, *10*, e1–e29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Welle, M.M.; Bley, C.R.; Howard, J.; Rüfenacht, S. Canine mast cell tumours: A review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet. Dermatol.* **2008**, *19*, 321–339. [[CrossRef](#)]
7. Pierini, A.; Lubas, G.; Gori, E.; Binanti, D.; Millanta, F.; Marchetti, V. Epidemiology of Breed-Related Mast Cell Tumour Occurrence and Prognostic Significance of Clinical Features in a Defined Population of Dogs in West-Central Italy. *Vet. Sci.* **2019**, *6*, 53. [[CrossRef](#)]
8. Patnaik, A.K.; Ehler, W.J.; MacEwen, E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.* **1984**, *21*, 469–474. [[CrossRef](#)]
9. Rigas, K.; Biasoli, D.; Polton, G.; Finotello, R.; Murphy, S.; Di Palma, S.; Starkey, M.; Verganti, S. Mast cell tumours in dogs less than 12 months of age: A multi-institutional retrospective study. *J. Small Anim. Pract.* **2020**, *61*, 449–457. [[CrossRef](#)]
10. 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.; et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet. Pathol.* **2011**, *48*, 147–155. [[CrossRef](#)]
11. Northrup, N.C.; Harmon, B.G.; Gieger, T.L.; Brown, C.A.; Carmichael, K.P.; Garcia, A.; Latimer, K.S.; Munday, J.S.; Rakich, P.M.; Richey, L.J.; et al. Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2005**, *17*, 245–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Avallone, G.; Rasotto, R.; Chambers, J.K.; Miller, A.D.; Behling-Kelly, E.; Monti, P.; Berlato, D.; Valenti, P.; Roccabianca, P. Review of Histological Grading Systems in Veterinary Medicine. *Vet. Pathol.* **2021**, *58*, 809–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Freytag, J.O.; Queiroz, M.R.; Govoni, V.M.; Pereira, I.V.A.; Pulz, L.H.; de Francisco Strefezzi, R.; Queiroga, F.L.; Cogliati, B. Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis. *Vet. Comp. Oncol.* **2021**, *19*, 529–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Scholzen, T.; Gerdes, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* **2000**, *182*, 311–322. [[CrossRef](#)]
15. Esteban-Villarrubia, J.; Soto-Castillo, J.J.; Pozas, J.; San Román-Gil, M.; Orejana-Martín, I.; Torres-Jiménez, J.; Carrato, A.; Alonso-Gordoa, T.; Molina-Cerrillo, J. Tyrosine Kinase Receptors in Oncology. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8529. [[CrossRef](#)]
16. Preziosi, R.; Morini, M.; Sarli, G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2004**, *16*, 554–561. [[CrossRef](#)]
17. Da Gil Costa, R.M.; Matos, E.; Rema, A.; Lopes, C.; Pires, M.A.; Gärtner, F. CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: Correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Vet. Res.* **2007**, *3*, 19. [[CrossRef](#)]
18. London, C.A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top. Companion Anim. Med.* **2009**, *24*, 106–112. [[CrossRef](#)]
19. London, C.A.; Malpas, P.B.; Wood-Follis, S.L.; Boucher, J.F.; Rusk, A.W.; Rosenberg, M.P.; Henry, C.J.; Mitchener, K.L.; Klein, M.K.; Hintermeister, J.G.; et al. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 3856–3865. [[CrossRef](#)]
20. Hahn, K.A.; Ogilvie, G.; Ogilvie, G.; Rusk, T.; Devauchelle, P.; Leblanc, A.; Legendre, A.; Powers, B.; Leventhal, P.S.; Kinet, J.-P.; et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J. Vet. Intern. Med.* **2008**, *22*, 1301–1309. [[CrossRef](#)]
21. Webster, J.D.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Kaneene, J.B.; Miller, R.; Resau, J.H.; Kiupel, M. The role of c-KIT in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* **2006**, *8*, 104–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vozdova, M.; Kubickova, S.; Fictum, P.; Cernohorska, H.; Fröhlich, J.; Rubes, J. Mutation and methylation status of KIT and TP53 in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours. *Vet. Comp. Oncol.* **2020**, *18*, 438–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Vozdova, M.; Kubickova, S.; Pal, K.; Fröhlich, J.; Fictum, P.; Rubes, J. Recurrent gene mutations detected in canine mast cell tumours by next generation sequencing. *Vet. Comp. Oncol.* **2020**, *18*, 509–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vozdova, M.; Kubickova, S.; Fictum, P.; Fröhlich, J.; Jelinek, F.; Rubes, J. Prevalence and prognostic value of c-kit and TP53 mutations in canine mast cell tumours. *Vet. J.* **2019**, *247*, 71–74. [[CrossRef](#)]
25. Nakano, Y.; Kobayashi, M.; Bonkobara, M.; Takanosu, M. Identification of a secondary mutation in the KIT kinase domain correlated with imatinib-resistance in a canine mast cell tumor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2017**, *188*, 84–88. [[CrossRef](#)]



26. Brocks, B.A.W.; Bertram, C.A.; Bartel, A.; Kirpensteijn, J.; Collins-Webb, A.; Catlin, C.; Thaiwong, T.; Kiupel, M. Internal Tandem Duplication of Exon 8 of c-kit Is Associated with Longer Total Survival in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet. Pathol.* **2021**, *58*, 315–324. [[CrossRef](#)]
27. Gentilini, F.; Turba, M.E.; Dally, C.; Takanosu, M.; Kurita, S.; Bonkobara, M. The secondary KIT mutation p.Ala510Val in a cutaneous mast cell tumour carrying the activating mutation p.Asn508Ile confers resistance to masitinib in dogs. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 64. [[CrossRef](#)]
28. Mochizuki, H.; Thomas, R.; Moroff, S.; Breen, M. Genomic profiling of canine mast cell tumors identifies DNA copy number aberrations associated with KIT mutations and high histological grade. *Chromosome Res.* **2017**, *25*, 129–143. [[CrossRef](#)]
29. Tamlin, V.S.; Bottema, C.D.K.; Woolford, L.; Dobson, E.C.; Kessell, A.E.; Peaston, A.E. Canine mast cell tumours part I: Clinical and survival outcomes. *Vet. Med. Sci.* **2022**, *8*, 1409–1420. [[CrossRef](#)]
30. Webster, J.D.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Miller, R.A.; Kaneene, J.B.; Kiupel, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet. Pathol.* **2007**, *44*, 298–308. [[CrossRef](#)]
31. Bae, S.; Milovancev, M.; Bartels, C.; Irvin, V.L.; Tuohy, J.L.; Townsend, K.L.; Leeper, H. Histologically low-grade, yet biologically high-grade, canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Vet. Comp. Oncol.* **2020**, *18*, 580–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kiupel, M.; Webster, J.D.; Miller, R.A.; Kaneene, J.B. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **2005**, *52*, 280–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Marino, D.J.; Matthiesen, D.T.; Stefanacci, J.D.; Moroff, S.D. Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981–1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1995**, *207*, 726–728. [[PubMed](#)]
34. Wobeser, B.K.; Kidney, B.A.; Powers, B.E.; Withrow, S.J.; Mayer, M.N.; Spinato, M.T.; Allen, A.L. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. *Vet. Pathol.* **2007**, *44*, 355–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Grassinger, J.M.; Floren, A.; Müller, T.; Cerezo-Echevarria, A.; Beitzinger, C.; Conrad, D.; Törner, K.; Staudacher, M.; Aupperle-Lellbach, H. Digital Lesions in Dogs: A Statistical Breed Analysis of 2912 Cases. *Vet. Sci.* **2021**, *8*, 136. [[CrossRef](#)]
36. Conrad, D.; Kehl, A.; Beitzinger, C.; Metzler, T.; Steiger, K.; Pfarr, N.; Fischer, K.; Klopffleisch, R.; Aupperle-Lellbach, H. Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Meuten, D.J.; Moore, F.M.; Donovan, T.A.; Bertram, C.A.; Klopffleisch, R.; Foster, R.A.; Smedley, R.C.; Dark, M.J.; Milovancev, M.; Stromberg, P.; et al. International Guidelines for Veterinary Tumor Pathology: A Call to Action. *Vet. Pathol.* **2021**, *58*, 766–794. [[CrossRef](#)]
38. Abrams, B.E.; Putterman, A.B.; Ruple, A.; Wavreille, V.; Selmic, L.E. Variability in tumor margin reporting for soft tissue sarcoma and cutaneous mast cell tumors in dogs: A systematic review. *Vet. Surg.* **2021**, *50*, 259–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Karbe, G.T.; Davis, E.; Runge, J.J.; Brown, D.C.; Holt, D.E. Evaluation of scar revision after inadequate primary excision of cutaneous mast cell tumors in 85 dogs (2000–2013). *Vet. Surg.* **2021**, *50*, 807–815. [[CrossRef](#)]
40. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022.
41. Heinze, G.; Ploner, M.; Jiricka, L. *logistf: Firth's Bias-Reduced Logistic Regression*. R Package Version 1.24.1. 2022. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=logistf> (accessed on 11 March 2023).
42. Venables, W.N.; Ripley, B.D. *Modern Applied Statistics with S*, 4th ed.; Springer: New York, NY, USA, 2002; ISBN 0-387-95457-0.
43. Zemke, D.; Yamini, B.; Yuzbasiyan-Gurkan, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet. Pathol.* **2002**, *39*, 529–535. [[CrossRef](#)]
44. Horta, R.S.; Lavalle, G.E.; Monteiro, L.N.; Souza, M.C.C.; Cassali, G.D.; Araújo, R.B. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Vet. Pathol.* **2018**, *55*, 212–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. McNiel, E.A.; Prink, A.L.; O'Brien, T.D. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. *Vet. Comp. Oncol.* **2006**, *4*, 2–8. [[CrossRef](#)]
46. Reynolds, B.D.; Thomson, M.J.; O'Connell, K.; Morgan, E.J.; Gummow, B. Patient and tumour factors influencing canine mast cell tumour histological grade and mitotic index. *Vet. Comp. Oncol.* **2019**, *17*, 338–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Biasoli, D.; Compston-Garnett, L.; Ricketts, S.L.; Birand, Z.; Courtney-Cahen, C.; Fineberg, E.; Arendt, M.; Boerkamp, K.; Melin, M.; Koltookian, M.; et al. A synonymous germline variant in a gene encoding a cell adhesion molecule is associated with cutaneous mast cell tumour development in Labrador and Golden Retrievers. *PLoS Genet.* **2019**, *15*, e1007967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Stefanello, D.; Buracco, P.; Sabattini, S.; Finotello, R.; Giudice, C.; Grieco, V.; Iussich, S.; Tursi, M.; Scase, T.; Di Palma, S.; et al. Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2015**, *246*, 765–769. [[CrossRef](#)]
49. Cruz, V.S.; Borges, J.C.A.; Nepomuceno, L.L.; Gonçalves, P.A.M.; Prado, Y.C.L.; Bianchi, C.; Fioravanti, M.C.S.; Araújo, E.G. Histological classification and expression of markers of canine mast cell tumors. *Vet. World* **2020**, *13*, 1627–1634. [[CrossRef](#)]
50. de Nardj, A.B.; Dos Santos Horta, R.; Fonseca-Alves, C.E.; de Paiva, F.N.; Linhares, L.C.M.; Firmo, B.F.; Ruiz Sueiro, F.A.; de Oliveira, K.D.; Lourenço, S.V.; de Francisco Strefezzi, R.; et al. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells* **2022**, *11*, 618. [[CrossRef](#)]

51. Thamm, D.H.; Weishaar, K.M.; Charles, J.B.; Ehrhart, E.J. Phosphorylated KIT as a predictor of outcome in canine mast cell tumours treated with toceranib phosphate or vinblastine. *Vet. Comp. Oncol.* **2020**, *18*, 169–175. [[CrossRef](#)]
52. Romansik, E.M.; Reilly, C.M.; Kass, P.H.; Moore, P.F.; London, C.A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* **2007**, *44*, 335–341. [[CrossRef](#)]
53. Giantin, M.; Vascellari, M.; Morello, E.M.; Capello, K.; Vercelli, A.; Granato, A.; Lopparelli, R.M.; Nassuato, C.; Carminato, A.; Martano, M.; et al. c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: Correlations with post-surgical prognosis. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2012**, *24*, 116–126. [[CrossRef](#)]
54. Chen, P.; Marconato, L.; Sabbatini, S.; Kiupel, M. Mutations in Exons 8 and 11 of *c-kit* Gene in Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors and Their Association with Cell Proliferation. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Tab. 4: Ergänzendes Material: Mutational analysis, histological and immunohistochemical findings and case description of dogs with digital mast cell tumours (n = 68)

animal no.	mutations in c-kit	mitotic figures/1 HPF	mitotic figures/10 HPF	multinuclear cells/10 HPF	cells with bizarre nuclei/10 HPF	karyomegaly	Patnaik	Kiupel	KIT pattern	Ki67 count	gender	breed	age (years)	affected limb (front/hind)	affected limb (left/right)	tumour diameter (cm)	tumour margin
1		0	0	0	0	< 10 %	1	low	2	8,4	F	Pug Dog	4	n.a.	n.a.	0,8	infiltrated
2		0	0	0	0	< 10 %	1	low	1	35,0	F	Mongrel	8	hind	right	0,5	narrow (< 3 mm)
3	ITD ex. 11	1	5	0	0	> 10 %	2	high	3	49,2	F	French Bulldog	3	n.a.	n.a.	1,6	infiltrated
4		0	0	0	0	< 10 %	2	low	2	24,0	M	French Bulldog	5	hind	left	1,5	infiltrated
5		1	2	0	0	< 10 %	2	low	3	6,0	F	Mongrel	8	n.a.	n.a.	1	clean
6	SNP int. 11	1	2	0	2	< 10 %	2	low	3	29,6	F	Puli	10	hind	left	1,4	clean
7		0	0	0	0	< 10 %	2	low	3	5,8	MC	Bernese Mountain Dog	6	hind	right	4	clean
8		2	3	0	0	< 10 %	2	low	3	31,0	M	German Sheperd	8	front	left	2,8	narrow (< 3 mm)
9		0	0	0	0	< 10 %	2	low	3	n.a.	FS	Labrador Retriever	4	hind	left	2,1	clean
10		2	3	0	0	< 10 %	2	low	3	4,6	M	Mongrel	n.a.	front	left	5,7	narrow (< 3 mm)
11		1	3	0	2	< 10 %	2	low	3	25,8	FS	Golden Retriever	13	n.a.	n.a.	2,1	infiltrated
12		3	7	2	3	> 10 %	3	high	3	5,6	M	Bullmastiff	8	n.a.	n.a.	4,1	clean
13		2	4	0	0	< 10 %	2	low	3	21,6	F	English Toy Terrier	9	hind	left	0,7	infiltrated
14		0	0	0	0	< 10 %	1	low	3	4,6	F	Labrador Retriever	11	hind	left	2,6	infiltrated
15		0	1	0	0	< 10 %	1	low	1	23,6	M	Havanese	11	n.a.	n.a.	2,5	clean
16		0	4	0	2	< 10 %	2	low	3	35,4	F	Bernese Mountain Dog	7	front	left	3,5	clean
17	ITD ex. 11 + SNP int. 11	3	7	0	5	< 10 %	3	high	2	55,4	FS	Beagle	11	front	right	2,8	clean
18		2	2	0	0	< 10 %	2	low	3	n.a.	MC	Labrador Retriever	6	n.a.	n.a.	1	narrow (< 3 mm)
19		1	1	0	1	< 10 %	2	low	3	6,4	M	Boston Terrier	4	front	right	1	infiltrated
20	ITD ex. 11 + SNP int. 11	1	1	0	0	< 10 %	2	low	3	29,2	MC	Munster-lander	8	n.a.	n.a.	2,1	clean
21	c.2020 G > A ex. 14	0	1	0	0	< 10 %	1	low	1	6,0	FS	Boxer	5	front	right	3,6	clean
22	SNP int. 11	0	3	0	0	< 10 %	2	low	1	25,6	M	Jack Russell Terrier	11	n.a.	n.a.	3,5	infiltrated
23		0	0	0	0	< 10 %	2	low	1	31,2	M	Labrador Retriever	10	front	left	5,7	infiltrated
24		0	0	2	3	< 10 %	2	high	3	n.a.	M	French Bulldog	3	front	left	3,6	infiltrated
25	SNP int. 11	2	3	0	1	< 10 %	2	low	1	13,0	MC	Mongrel	2	front	left	2,5	infiltrated
26		4	9	1	5	> 10 %	3	high	1	29,6	F	Cocker Spaniel	12	hind	right	5	infiltrated
27	ITD ex. 11	3	6	0	5	< 10 %	3	high	3	77,2	F	Mongrel	9	front	right	2,3	clean

## Eigene Untersuchungen

28	SNP int. 11	0	0	0	0	< 10 %	1	low	3	51,2	FS	French Bulldog	7	front	left	1,1	clean
29		1	2	0	2	< 10 %	2	low	3	31,6	M	Boxer	8	n.a.	n.a.	2,3	clean
30	SNP int. 11	0	0	0	0	< 10 %	2	low	1	1,4	FS	American Staffordshire Terrier	12	hind	left	2	narrow (< 3 mm)
31		0	0	0	0	< 10 %	2	low	3	21,0	M	Boxer	8	front	right	7	infiltrated
32	ITD ex. 11	3	7	0	3	> 10 %	3	high	2	58,4	FS	French Bulldog	4	front	left	2,1	clean
33		3	7	0	4	> 10 %	3	high	3	12,8	F	Boxer	7	front	left	2,5	clean
34		1	1	0	0	< 10 %	2	low	1	28,6	FS	Mongrel	6	hind	right	1,6	infiltrated
35		0	0	0	0	< 10 %	1	low	1	17,6	M	Boxer	8	n.a.	n.a.	3,8	infiltrated
36	SNP int. 11	1	2	0	0	< 10 %	2	low	3	55,4	F	Briard	11	front	left	3	clean
37		0	0	0	0	< 10 %	1	low	1	38,8	FS	Maltese	10	front	left	2,5	clean
38	SNP int. 11	0	0	0	0	< 10 %	2	low	1	13,6	M	Golden Retriever	3	front	right	2,5	clean
39		1	1	0	1	< 10 %	2	low	1	39,4	M	Coton de Tuléar	9	front	left	4,7	infiltrated
40		0	0	0	0	< 10 %	2	low	1	9,6	MC	Golden Retriever	9	front	right	2,5	infiltrated
41	SNP ex. 11 + int. 11	0	0	0	0	< 10 %	1	low	1	15,8	MC	Mongrel	9	front	left	1,4	infiltrated
42		1	1	0	0	< 10 %	2	low	3	34,2	M	Labrador Retriever	5	front	left	4,5	infiltrated
43	SNP int. 11	0	0	0	0	< 10 %	2	low	3	54,4	M	Pug Dog	4	hind	right	2,4	clean
44		1	2	0	0	< 10 %	2	low	1	74,4	M	Siberian Husky	11	hind	left	3,3	infiltrated

45	ITD ex. 11	1	1	0	0	< 10 %	2	low	3	54,8	FS	Mongrel	14	hind	right	3,6	clean
46	SNP int. 11	0	0	0	0	< 10 %	1	low	3	20,2	M	Pug Dog	5	front	left	5,4	infiltrated
47	ITD ex. 11	1	3	0	0	< 10 %	2	low	2	44,6	M	Bracke	15	front	left	4,6	infiltrated
48		0	0	0	0	< 10 %	2	low	3	26,8	F	Mongrel	8	front	left	3,6	clean
49	SNP ex. 11 + int. 11	0	0	0	0	< 10 %	2	low	1	15,4	M	Pug Dog	5	front	left	1,8	clean
50	ITD ex. 11	4	8	2	4	< 10 %	3	high	3	28,0	F	French Bulldog	8	front	left	2,4	infiltrated
51		0	0	0	0	< 10 %	1	low	2	29,0	F	German Sheperd	7	hind	left	1,9	clean
52		1	1	0	0	< 10 %	2	low	1	4,8	MC	Dogo Argentino	6	front	left	3,4	infiltrated
53		1	2	0	0	< 10 %	2	low	1	29,2	M	Yorkshire Terrier	3	hind	left	0,8	clean
54		0	0	0	1	< 10 %	2	low	3	7,8	F	Labrador Retriever	10	front	left	1,9	infiltrated
55		0	0	0	0	< 10 %	2	low	1	10,4	MC	French Bulldog	12	front	right	2,2	infiltrated
56		0	0	0	0	< 10 %	1	low	1	20,2	MC	Yorkshire Terrier	11	front	right	1,1	clean
57	SNP int. 11	0	0	0	0	< 10 %	2	low	2	24,4	MC	Golden Retriever	10	front	left	2,5	clean
58		0	0	0	1	< 10 %	2	low	3	6,6	F	Boxer	10	n.a.	n.a.	6,7	infiltrated
59		2	3	0	0	< 10 %	2	low	1	5,8	M	Labrador Retriever	10	front	left	3	infiltrated
60		0	0	0	0	< 10 %	1	low	1	7,0	F	Chihuahua	13	front	left	0,2	infiltrated
61		0	0	0	0	< 10 %	1	low	1	31,8	F	Mongrel	9	hind	right	2	clean

62	SNP int. 11	1	2	0	0	< 10 %	2	low	2	9,2	FS	Mongrel	9	hind	left	3,4	clean
63		1	1	0	0	< 10 %	2	low	2	6,4	F	Border Collie	7	front	left	1,8	infiltrated
64	SNP int. 11	1	2	0	0	< 10 %	2	low	1	24,6	FS	Golden Retriever	12	hind	right	3,9	infiltrated
65		1	2	1	0	< 10 %	2	low	1	5,0	M	Pug Dog	8	n.a.	n.a.	1,7	infiltrated
66		1	2	0	0	< 10 %	2	low	3	25,0	F	Mongrel	12	front	left	4	narrow (< 3 mm)
67		0	0	0	0	< 10 %	2	low	1	7,8	MC	Mongrel	7	n.a.	n.a.	2,4	infiltrated
68		0	0	0	0	< 10 %	1	low	1	5,4	M	Golden Retriever	4	hind	left	2	clean
<b>Abbreviations: SNP: single nucleotide polymorphism; ITD: internal tandem duplication; ex.: exon; int.: intron; HPF: high power field; F: female; FS: female spayed; M: male; MC: male castrated; n.a.: not available.</b>																	



## 4 Diskussion

In den beiden vorliegenden Studien wurden kanine Melanome und Mastzelltumoren der Zehe erstmals umfassend untersucht. Mit Blick auf die Melanome der Zehe lag der Fokus dabei auf der Mutationsanalyse, da sich diesbezüglich kaum Daten in der Literatur fanden. Die Mastzelltumoren der Zehe waren bis auf einzelne Studien, die sich mit ihrem Anteil innerhalb der Zehentumorpopulation beschäftigten, gar nicht untersucht worden. Deshalb weitete die zweite Studie ihre Methoden zusätzlich zu der genetischen Analyse noch auf die histologische Graduierung und immunhistologische Verfahren aus.

### 4.1 Untersuchungsgut, Auswertungsmethoden und Limitationen

Im Rahmen der beiden Studien wurden 86 kanine Melanome der Zehe oder des Krallenbettes (Studie 1) und 68 Hundezehen mit Mastzelltumoren (Studie 2) aus den Jahren 2014 bis 2021 (Studie 1) bzw. bis 2022 (Studie 2) verwendet, die zur Routinediagnostik an die Laboklin GmbH & Co. KG eingesandt worden waren. Voraussetzung für die Inklusion eines Falles war, dass im Vorfeld bereits eine entsprechende eindeutige histopathologische Diagnose gestellt worden war und ein in Paraffin eingebetteter und nicht entkalkter Tumorblock zur Verfügung stand. Eine Entkalkung hätte durch die Zerstörung von DNA und Proteinen die anschließenden molekulargenetischen Untersuchungen (und immunhistologischen Verfahren in Studie 2) gestört. In Studie 2 wurde außerdem darauf geachtet, dass ausschließlich digitale Mastzelltumoren dermalen Ursprunges analysiert wurden und solche mit subkutanem Ursprung exkludiert wurden. Zusätzliche Informationen zu den Fällen wurden anhand der archivierten Untersuchungsanträge erfasst, die von den einsendenden Kliniken und Praxen ausgefüllt worden waren. Hierzu gehörten in beiden Studien: Alter der Tiere, Geschlecht und Kastrationsstatus, Rasse, von der Neoplasie betroffene Gliedmaße und Größe der Neoplasie. In Studie 1 wurden außerdem die Fellfarben der Hunde erfasst und ein Teil der Überlebenszeiten rekonstruiert. In Studie 2 waren einige Tumorgößen nur unzureichend genau im laborinternen System erfasst, was durch eine Vermessung der digitalisierten mikroskopischen Präparate kompensiert wurde. Das in beiden Studien verwendete Probenmaterial (Tumorgewebe und Blutproben) war im Rahmen der Routinediagnostik an die Laboklin GmbH & Co. KG gesandt worden. Daher bestand keine Notwendigkeit, für das Vorhaben einen Tierversuchsantrag zu stellen, was durch einen Beschluss der Bayerischen Landesregierung (RUF-55.2.2-2532-1-86-5) gestützt wird.

Das Alter der Hunde mit Melanomen der Zehe in Studie 1 variierte zwischen 5 und 15 Jahren mit einem Median von 11 Jahren und stimmt somit mit den Daten aus den wenigen anderen Studien, die Zehenmelanome untersucht hatten, überein (Grassinger et al. 2021; Wobeser et

al. 2007; Henry et al. 2005). Männliche Tiere waren in der Überzahl (51 männlich, 34 weiblich, 1 unbekannt), was mit der Studie von Grassinger et al. (2021) vergleichbar ist. Allerdings teilte sich die Studie von Grassinger et al. (2021) einen Teil des Untersuchungsgutes mit der vorliegenden Arbeit, da es sich bei allen Studien um Laboklin-interne Projekte handelte. Die Übereinstimmung der Daten war somit zu erwarten. Zu den reinrassigen Hunden in Studie 1, die mit mehr als 3 Tieren vertreten waren, zählten Labrador Retriever, (Riesen-)Schnauzer, Rottweiler und Golden Retriever. Diese Rassen werden in der Literatur ebenso als prädisponiert für die Entstehung von Zehenmelanomen beschrieben (Grassinger et al. 2021; Goldschmidt und Goldschmidt 2017; Gillard et al. 2014; Henry et al. 2005; Smith et al. 2002). Die Überlebensrate der Hunde mit Melanomen der Zehe im eigenen Tiergut betrug 24 % für 1 Jahr und 12 % für 2 Jahre. Innerhalb der Gruppe der Tiere, bei denen der Tod höchstwahrscheinlich tumorassoziiert war (mit röntgenologisch nachgewiesener Metastasierung zum Todeszeitpunkt oder Zeitpunkt der Euthanasie), lagen die Überlebensraten bei 14 % für 1 Jahr und 5 % für 2 Jahre. Die Überlebenszeiten ähneln damit den Daten in der Literatur für digitale Melanome (Henry et al. 2005; Marino et al. 1995) und bestätigten die insgesamt ungünstige Prognose dieses Tumors.

Das Alter der Hunde mit Mastzelltumoren der Zehe in Studie 2 variierte zwischen 2 und 15 Jahren mit einem Median von 8 Jahren. Die Geschlechterverteilung war ausgewogen (35 männlich, 33 weiblich). Alter und Geschlecht entsprechen damit den Daten, die für kanine kutane Mastzelltumoren generell (Śmiech et al. 2019; Blackwood et al. 2012) und Mastzelltumoren der Zehe (Grassinger et al. 2021; Wobeser et al. 2007) verfügbar sind. Häufig vertretene reinrassige Hunde (mehr als 2 Tiere) in der eigenen Studie 2 waren: Französische Bulldoggen, Labrador Retriever, Boxer, Golden Retriever und Mops. Diese Rassen werden auch häufig in anderen Studien zu kutanen Mastzelltumoren angeführt (Aupperle-Lellbach et al. 2022; Pierini et al. 2019; Śmiech et al. 2019). Für Mastzelltumoren der Zehe lagen, bis auf die Studie von Grassinger et al. (2021), keine umfangreichen Analysen der häufig betroffenen Rassen vor. Für Französische Bulldoggen, Boxer, Golden Retriever, Labrador Retriever und Mops ist aus der Literatur bekannt, dass diese Rassen eher dazu neigen, gut differenzierte kutane Mastzelltumoren auszubilden (Śmiech et al. 2019; McNiel et al. 2006). Dies spiegelte sich innerhalb der digitalen Mastzelltumoren der zweiten Studie wider – mit einer Ausnahme: Französische Bulldoggen waren (im Vergleich zu den am häufigsten vertretenden Mischlingshunden) deutlich häufiger von schlecht differenzierten Mastzelltumoren der Zehe betroffen.

In beiden Studien wurde zunächst die Makroskopie der Tumoren und deren Durchmesser anhand der für die Routinediagnostik erstellten Befunde erfasst. Für die mikroskopische Beurteilung bildeten die Histologie an Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Tumorschnitten



sowie die Beurteilung der Tumorränder die Basis. Die digitalen Melanome wurden kategorisiert nach Pigmentationsgrad, und in Anlehnung an die Arbeit von Spangler und Kass (2006), nach Mitosefiguren pro 10 *high power fields* (HPF), Kernatypien und Zellmorphologie. Bei letzterer wurde unterschieden zwischen epitheloiden, spindeligen und runden Zellen sowie Zellen vom *balloon-cell* Typ.

Für die histologische Graduierung der digitalen Mastzelltumoren wurden die beiden Systeme (Kiupel et al. 2011; Patnaik et al. 1984) verwendet, die für kutane Mastzelltumoren entwickelt worden waren. Der lichtmikroskopische Bereich von 10 HPF kann bedeutend variieren, je nachdem welches Okular verwendet wird (Meuten et al. 2021). Aus diesem Grund wurden alle HE-Präparate der zweiten Studie digitalisiert und, in Anlehnung an die Empfehlungen von Meuten et al. (2021), der Bereich von 10 HPF im digitalisierten Präparat als 2,37 mm<sup>2</sup> definiert. Das Zählen der Zellen wurde unter Zuhilfenahme von digitalen Markierungen durchgeführt.

Studie 2 beinhaltete auch immunhistologische Verfahren. Das Expressionsmuster der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT wurde in die drei von Kiupel et al. (2004) beschriebenen Muster eingeteilt. Für die Auszählung der Ki67-Antigen-exprimierenden Zellen wurde der Grenzwert von 23 Ki67-Antigen-positiven Zellen in einer *ocular grid area* von 1 cm<sup>2</sup> bei 400-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung gewählt (Webster et al. 2007). Der von Webster et al. (2007) definierte lichtmikroskopische Bereich entsprach einer Fläche von 250 x 250 µm im digitalisierten Präparat. Fünf dieser Flächen wurden in Bereichen mit hoher Proliferationsaktivität platziert, die Ki-67-Antigen-positiven Zellen digital markiert, gezählt und der Mittelwert errechnet.

Für die molekulargenetischen Untersuchungen wurde die DNA aus Tumoren gewonnen, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) worden waren. Die Sequenz von *c-KIT* Exon 11 in den digitalen Melanomen und Mastzelltumoren (Studie 1 und 2) wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Sanger-Sequenzierung untersucht. Ebenso wurden von *c-KIT* die Exons 8, 9 und 14 (Studie 2) und von *KRAS* und *NRAS* die Exons 2 und 3 (Studie 1) nach dem gleichen Prinzip analysiert. Für den Nachweis der *BRAF* V595E-Variante (Studie 1) wurde die *droplet digital* PCR (ddPCR) verwendet. Die *copy number variation* (CNV) von *KITLG* (Studie 1) wurde ebenfalls mittels ddPCR aus den Resten von Blutproben untersucht, die von den behandelnden Kliniken und Praxen für eine klinisch-chemische und hämatologische Vorsorgeuntersuchung eingesandt worden waren.

In beiden Studien ist die retrospektive Untersuchung der Tumorproben aus dem Archiv ein limitierender Faktor. Die Einsendeanträge, die von den einsendenden Kolleginnen und Kollegen ausgefüllt worden waren, waren nicht in allen Fällen vollständig. Durch den

telefonischen und schriftlichen Kontakt zu den Einsendenden konnten zusätzlich noch einige Informationen gewonnen werden.

Dies ließ in Studie 1 eine Analyse und statistische Auswertung der Überlebenszeiten zu. Doch auch hier konnten nicht mehr bei allen Tieren die relevanten Informationen (insbesondere der Todeszeitpunkt und die Ursache für den Tod oder die Euthanasie) erfasst werden. Daher musste die Überlebenszeitanalyse auf einen kleinen Teil der Tiere beschränkt werden.

In Studie 2 waren diese Informationen trotz umfangreicher Bemühungen noch unvollständiger, weshalb auf eine Analyse der Überlebenszeiten verzichtet werden musste. Die Problematik bestand darin, dass aufgrund des Einsendezeitraumes, der bis in das Jahr 2014 zurückreichte, viele der TierärztInnen keinen Zugriff mehr auf die abgefragten Informationen hatten oder die Tiere nur für die Entfernung des Tumors vorstellig waren und im Anschluss in einer anderen Klinik oder Praxis weiterbehandelt wurden.

Die in Studie 2 gewonnenen Daten zu digitalen Mastzelltumoren sollten mit den Daten verglichen werden, die zu kutanen Mastzelltumoren bereits in der Literatur verfügbar waren. Es stellte sich heraus, dass dieser Vergleich nur in limitierter Form durchführbar war. Gründe dafür waren, dass publizierte Studien in einigen Fällen keine Aussage darüber machten, aus welchen anatomischen Lokalisationen ihr Untersuchungsgut stammte. War die Information vorhanden, wurden anatomische Tumorlokalisationen allerdings häufig in Gruppen zusammengefasst (z. B. Thorax, Hals, Gliedmaße), woraus sich immer noch nicht präzise ableiten ließ, ob Mastzelltumoren auch an der Zehe lokalisiert waren und mit welchem prozentualen Anteil sie vertreten waren. Die in der Literatur beschriebenen kaninen Mastzelltumoren waren für einen Vergleich daher nicht im Sinne einer echten Kontrollgruppe verwertbar, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass manche der Studien auch digitale Mastzelltumoren in ihre Analysen eingeschlossen hatten. Nichtsdestotrotz wurde der Vergleich „digitale Mastzelltumoren *versus* kutane Mastzelltumoren aus der Literatur“ an relevanten Eckpunkten der Studie, wie beispielsweise der histologischen Graduierung, durchgeführt, um die Daten in den Gesamtkontext der kaninen kutanen Mastzelltumoren einordnen zu können.

#### **4.2 Molekulargenetische Charakteristika von kaninen digitalen Melanomen**

Bemerkenswerterweise konnte in der vorliegenden Arbeit ein beachtlicher Anteil (40,7 %) an kaninen digitalen Melanomen identifiziert werden, die Träger einer *RAS*-Mutation waren. Mutationen in *KRAS* Exon 2, Codone 12 und 13 fanden sich in 25,6 % der Fälle, und 3,6 % der Fälle trugen eine Mutation in *KRAS* Exon 3, Codon 61. *NRAS* Exon 2, Codone 12 und 13

waren mutiert in 2,4 % und *NRAS* Exon 3, Codon 61 in 10,5 % der Fälle. *RAS*-Mutationen sind im humanen Melanom (Cicenas et al. 2017) und den humanen akralen Melanomen (Yeh et al. 2019) häufiger innerhalb der *NRAS*-Isoform lokalisiert. Sie betreffen, unseren Beobachtungen nach, im digitalen Melanom des Hundes allerdings häufiger die *KRAS*-Isoform.

Für kanine orale bzw. mukosale Melanome sind in der Literatur *KRAS*-Mutationsraten von lediglich 3 % (Hendricks et al. 2018) bis 5 % (Wong et al. 2019) beschrieben. Der Vergleich zeigt, dass kanine digitale Melanome sich auf molekulargenetischer Ebene von den oralen bzw. mukosalen Formen unterscheiden, da sie einen deutlich höheren Anteil (bis zu 25 %) an *KRAS*-Mutationen aufweisen. Diese molekulargenetischen Unterschiede verdeutlichen, dass weitere Studien zu kaninen Melanomen in verschiedenen Lokalisationen, unter Berücksichtigung weiterer Onkogene, sinnvoll wären. Die Analysen könnten zum weiteren molekulargenetischen Verständnis dieser kaninen Tumoren beitragen.

Sowohl das Überleben der Tiere als auch die Ausprägung der histologischen Malignitätskriterien ließen sich statistisch weder in eine Beziehung zu dem Vorhandensein von *RAS*-Mutationen insgesamt noch zu dem Auftreten von *KRAS*-Mutationen setzen. Auf eine statistische Analyse der *NRAS*-Mutationen wurde in diesem Kontext verzichtet, da mit 11 *NRAS*-Mutationsträgern keine repräsentative Fallzahl zur Verfügung stand. Ein Fazit daraus ist, dass das Vorhandensein von *RAS*-Mutationen im digitalen Melanom des Hundes keine prognostische Aussagekraft besitzt.

*RAS*-Mutationen im digitalen Melanom könnten jedoch von therapeutischer Relevanz sein. Beim Melanom des Menschen wurden MEK/RAF-Inhibitoren bereits eingesetzt und es wurden vielversprechende Ergebnisse erzielt (Savoia et al. 2019). Studien an kaninen Melanom-Zelllinien (Wei et al. 2016) und humanen bzw. kaninen Melanomen (Fowles et al. 2015) zeigten, dass über die Inhibition des MAPK-Signalweges eine Unterdrückung des Tumorwachstums erreicht werden konnte, auch wenn beide Studien sich nicht auf die alleinige Inhibition des MAPK-Signalweges beschränkten und zusätzlich den PI3K/mTOR- (Wei et al. 2016) und den PI3K/AKT-Signalweg (Fowles et al. 2015) inhibierten. Beide Studien diskutierten außerdem eine mögliche alternative Aktivierung der Signalwege. In einer Studie von Das et al. (2019) wurden verschiedene kanine Tumor-Zelllinien auf Mutationen untersucht. *KRAS*- und *NRAS*-Mutationen fanden sich in zwei verschiedenen Melanom-Zelllinien, und auch in einer Übergangszellkarzinom-Zelllinie konnte *KRAS* als mutiert identifiziert werden. Alle Zelllinien waren zudem sensitiv gegenüber dem MEK 1/2-Inhibitor Trametinib (Das et al. 2019). Dies ist ein Indiz dafür, dass *RAS*-Mutationen auch außerhalb des kaninen Melanoms als *target* in Frage kommen könnten. Zukünftig ist weitere

Forschung auf diesem Gebiet sicherlich notwendig und es besteht die Möglichkeit, dass daraus therapeutische Optionen abgeleitet werden können, die am digitalen Melanom des Hundes anwendbar sind.

Die humane *BRAF* V600E-Variante wurde in ca. 60 % aller humanen Melanome gefunden (Goel et al. 2006; Tsao et al. 2004; Brose et al. 2002; Davies et al. 2002). Ihr kanines Gegenstück ist die *BRAF* V595E-Variante, die besonders häufig in kaninen Übergangszell- und Prostatakarzinomen auftritt (Mochizuki und Breen 2015). Im kaninen digitalen Melanom fand sie sich in der vorliegenden Arbeit nicht. *BRAF*-Mutationen scheinen daher im Melanom der Zehe des Hundes keine relevante Rolle zu spielen. Das Gleiche gilt für die in der Humanmedizin eingesetzten *BRAF*-Inhibitoren, die in der Konsequenz für das kanine digitale Melanom keine therapeutische Option darstellen.

Die Studie von Chu et al. (2013) war zuvor die einzige, die bei einem Probenumfang von 49 kaninen Melanomen auch 3 digitale Melanome mit in ihr Untersuchungsgut einschloss und diese auf *c-KIT*-Mutationen in Exon 11 untersuchte. Allerdings fanden sich Mutationen nur in den Lokalisationen, die nicht die Zehe betrafen. In der vorliegenden Arbeit wurden 70 digitale Melanome auf *c-KIT*-Mutationen in Exon 11 untersucht und es konnte ebenfalls in keinem der Fälle eine Mutation nachgewiesen werden, was die Ergebnisse von Chu et al. (2013) in größerem Umfang bestätigt. Es wurde lediglich in 16 von 70 Fällen innerhalb von *c-KIT* Exon 11 eine nicht-kodierende Variante gefunden, die zwar einen Austausch der Base Cytosin durch Thymin bewirkt, allerdings keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der *KIT*-Proteinstruktur hat. Dieser Einzelnukleotid-Polymorphismus ist in der Gendatenbank ENSEMBL unter der SNP-Nr. rs853024368 gelistet. Kodierende *c-KIT*-Mutationen spielen im humanen Melanom eine Rolle (Beadling et al. 2008) und wurden auch im kaninen Melanom in geringem Umfang beobachtet (Chu et al. 2013). Im kaninen digitalen Melanom scheinen sie allerdings innerhalb des Exons 11, unseren Beobachtungen nach, keine Rolle zu spielen. Wie Smedley et al. (2021) bereits gezeigt haben, sind *c-KIT*-Mutationen in kaninen oralen Melanomen in geringem Umfang auch außerhalb des Exons 11 zu finden. Mit Blick auf zukünftige Studien wäre ein denkbarer Ansatz, die *c-KIT*-Mutationsanalyse in kaninen digitalen Melanomen auf weitere Exons auszuweiten. Sollten dadurch *c-KIT*-Mutationen außerhalb des Exons 11 in kaninen Melanomen der Zehe identifiziert werden, könnte über klinische Studien evaluiert werden, ob der Einsatz von Kinaseinhibitoren einen therapeutischen Nutzen hat.

Eine ältere Studie hat gezeigt, dass *copy number variations* von *KITLG* in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von digitalen Plattenepithelkarzinomen in Pudeln mit schwarzer Fellfarbe stehen (Karyadi et al. 2013). In dieser Studie wurden dabei 4

Kopien oder mehr als prädisponierend angegeben. Eine weitere Arbeit identifizierte ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung von digitalen Plattenepithelkarzinomen bei schwarzen Riesenschnauzern im Zusammenhang mit einer CNV von *KITLG* von über 5,8 (Aupperle-Lellbach et al. 2023). Die vorliegende Arbeit untersuchte als erste ihrer Art CNV von *KITLG* in 9 Blutproben von Hunden mit digitalen Melanomen und fand eine Kopienzahl, die zwischen 4 und 6 variierte. Dabei hatten 5 der 9 untersuchten Tiere eine dunkle Fellfarbe (n = 4 schwarz; n = 1 black & tan) und 4 dieser 5 Hunde wiesen mehr als 4 Genkopien auf. Generell waren mehr Hunde mit dunklen Fellfarben (n = 31 schwarz; n = 15 black & tan) vertreten als solche mit hellen Fellfarben (n = 23). Die Hypothese, dass CNV von *KITLG* an der Entstehung von Melanomen in Hunden mit dunklen oder schwarzen Fellfarben beteiligt sein könnten, konnte aufgrund eines Mangels an Kontrolldaten leider noch nicht bewiesen werden.

#### **4.3 Histologische, immunhistologische und molekulargenetische Eigenschaften von kaninen digitalen Mastzelltumoren**

Im Rahmen der eigenen Studie 2 wurden etwas mehr als zwei Drittel der untersuchten Mastzelltumoren (67,6 %) dem Patnaik Grad II zugeordnet. 22,1 % der Fälle wurden als Patnaik Grad I klassifiziert und die verbleibenden 10,3 % waren Patnaik Grad III. Damit waren die Patnaik Grad II-Tumoren deutlich in der Überzahl – ein Ergebnis, das mit dem vergleichbar ist, was hinsichtlich der Patnaik-Graduierung für kutane Mastzelltumoren in der Literatur berichtet wird. Hier hat der Patnaik Grad II einen Anteil von 43 % bis 75 % (Cruz et al. 2020; Reynolds et al. 2019; Stefanello et al. 2015; Patnaik et al. 1984). Wie erwartet, entsprachen 86,8 % der digitalen Mastzelltumoren dem gut differenzierten Kiupel Grad (*low-grade*) und die restlichen 13,2 % dem schlecht differenzierten Kiupel Grad (*high-grade*). Dabei konnte in der kombinierten Betrachtung beider Graduierungssysteme der Patnaik Grad I immer dem Kiupel *low-grade* zugeordnet werden und alle Patnaik Grad III-Tumoren entsprachen dem Kiupel *high-grade*. Innerhalb der Patnaik Grad II-Tumoren waren 95,7 % Kiupel *low-grade*-Tumoren und die verbleibenden 4,3 % entsprachen dem Kiupel *high-grade*. Diese Verhältnisse der beiden Graduierungssysteme zueinander wurden in einer Übersichtsarbeit auch für kutane Mastzelltumoren beschrieben (Avallone et al. 2021). Demnach wäre der digitale Mastzelltumor bei alleiniger Betrachtung der histologischen Ergebnisse in seiner Dignität vergleichbar mit den Mastzelltumoren in häufig vertretenen kutanen Lokalisationen.

Mittels immunhistologischer Verfahren wurde die Rezeptor-Tyrosinkinase KIT dargestellt. Bei 41,2 % der digitalen Mastzelltumoren wurde das membranassoziierte, bei 13,2 % das fokal zytoplasmatische und bei 45,6 % das diffus zytoplasmatische Muster exprimiert. Damit exprimierten mehr als die Hälfte (58,8 %) der Tumoren ein aberrantes KIT-

Expressionsmuster. Laut einer Meta-Analyse von fünf Studien liegt der Anteil an aberranten KIT-Expressionsmustern in kaninen kutanen Mastzelltumoren bei ca. 70 % (Freytag et al. 2021), was mit den digitalen Mastzelltumoren der vorliegenden Arbeit prinzipiell vergleichbar wäre. Allerdings fällt auf, dass beispielsweise in einer dieser Studien, die kutane Mastzelltumoren nach dem Kiupel-System graduiert hat (Thompson et al. 2016), nur 60 % dem gut differenzierten Grad (*low-grade*) und 40 % dem schlecht differenzierten Grad (*high-grade*) entsprachen. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen in diesem Punkt eine Abweichung, da ein vergleichbar hoher Anteil an aberranten KIT-Expressionsmustern gefunden wurde, obwohl lediglich 13,2 % der digitalen Mastzelltumoren *high-grade*-Tumoren waren.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit in 65 von 68 Fällen das Ki-67-Antigen detektiert. In den verbleibenden 3 von 68 Fällen konnte trotz mehrfacher Wiederholung der Prozedur kein auswertbares immunhistologisches Signal erzeugt werden. 52,3 % der digitalen Mastzelltumoren lagen über dem von Webster et al. (2007) für kutane Mastzelltumoren beschriebenen Grenzwert von 23 Ki-67-Antigen-positiven Zellen pro *ocular grid area*. Der Median der Ki-67-Antigen-positiven Zellen pro definiertem Bereich lag bei 24,0. Freytag et al. (2021) beschreiben in ihrer Meta-Analyse einen Anteil von ca. 28 % der kaninen Mastzelltumoren, die eine erhöhte Ki-67-Antigen-Expression aufweisen – was deutlich unter dem liegt, was in der vorliegenden Arbeit für die digitalen Mastzelltumoren beobachtet wurde. In der Meta-Analyse wird allerdings auch darauf hingewiesen, dass die Wahl unterschiedlicher Grenzwerte und die Verwendung verschiedener Ki-67-Antikörper-Verdünnungen den Vergleich erschweren und hier ein dringender Standardisierungsbedarf besteht (Freytag et al. 2021).

Für kutane Mastzelltumoren ist beschrieben, dass eine hohe Mitosezahl, ein aberrantes KIT-Expressionsmuster und ein erhöhter Anteil an Ki-67-Antigen-positiven Zellen mit einem höheren und damit schlecht differenzierten histologischen Grad korreliert (Romansik et al. 2007; Webster et al. 2007; Kiupel et al. 2004). Für die Mitosezahl konnte diese Beziehung auch in den digitalen Mastzelltumoren beobachtet werden, da eine hohe Mitosezahl signifikant ( $p < 0,001$ ) mit einer höheren Graduierung in beiden Systemen assoziiert war. Die beiden immunhistologischen Marker KIT und Ki-67-Antigen hatten keine statistische Beziehung zueinander. Jedoch konnte im Rahmen eines logistischen Regressionsmodelles gezeigt werden, dass das KIT-Muster signifikant ( $p = 0,027$ ) mit dem Patnaik-System assoziiert war und die Ki-67-Antigen-Expression in einer signifikanten ( $p = 0,03$ ) Beziehung zum Kiupel-System stand. Der hohe Anteil an digitalen Mastzelltumoren, die ein atypisches KIT-Expressionsmuster und eine Ki-67-Antigen-Zählung über dem Grenzwert von 23 Ki-67-Antigen-positiven Zellen aufwiesen, war ein bemerkenswertes Ergebnis. Zusammenfassend

lässt sich sagen, dass die digitalen Mastzelltumoren trotz der insgesamt günstigen histologischen Graduierung durchaus auch als prognostisch ungünstig eingestuft werden könnten, wenn man die Ergebnisse der Immunhistologie mit einbezieht. Die Resultate der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen standen somit im Kontrast zueinander.

Der Mangel an verwertbaren Daten zu den klinischen Verläufen in dieser retrospektiven Studie 2 limitierte den Interpretationsspielraum der gewonnenen Ergebnisse. Zukünftige Studien scheinen nötig, die durch die zusätzliche Inkludierung einer Überlebenszeitanalyse die im Kontrast zur histologischen Graduierung stehenden Ergebnisse der KIT- und Ki-67-Immunhistologie auf ihre prognostische Aussagekraft prüfen.

Die molekulargenetischen Untersuchungen ergaben als wichtigstes Ergebnis, dass 12,7 % der digitalen Mastzelltumoren eine interne Tandemduplikation (ITD) in *c-KIT* Exon 11 hatten. Dieser Anteil ist vergleichbar mit den aus der Literatur verfügbaren Daten für kutane Mastzelltumoren (Tamlin et al. 2022; Seung et al. 2021; Vozdova et al. 2020; Takeuchi et al. 2013; Letard et al. 2008). Für kutane Mastzelltumoren ist außerdem beschrieben, dass ITD in *c-KIT* Exon 11 mit einem höheren Patnaik- und Kiupel-Grad, einer höheren Mitosezahl, einer erhöhten Anzahl an Ki-67-Antigen-positiven Zellen und dem Auftreten von aberranten KIT-Expressionsmustern korrelieren (Tamlin et al. 2022; Brocks et al. 2021; Horta et al. 2018b; Mochizuki et al. 2017; Webster et al. 2007; Webster et al. 2006). Diese Beziehungen spiegeln sich ebenso in der statistischen Analyse der digitalen Mastzelltumoren wider, was dafür spricht, dass das Vorhandensein von ITD in *c-KIT* Exon 11 eine Hilfe bei der Identifizierung von schlecht differenzierten digitalen Mastzelltumoren sein kann. In *c-KIT* Exon 11 wurde außerdem in 2 Fällen ein nicht-kodierender Einzelnukleotid-Polymorphismus gefunden, der in der Form bereits in Studie 1 detektiert wurde. In 16 weiteren Fällen fand sich in Studie 2 ein anderer Einzelnukleotid-Polymorphismus, bei dem es innerhalb des Intron 11 von *c-KIT* zu einem Austausch der Base Thymin durch Cytosin kommt. Dieser Polymorphismus wurde in der Literatur bereits beschrieben und hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des KIT-Proteins (Zemke et al. 2002).

Mutationen in *c-KIT* Exon 11 sind im digitalen Mastzelltumor außerdem von therapeutischer Relevanz. Der Kinaseinhibitor Masitinib ist von der Europäischen Arzneimittelagentur zur Behandlung von kaninen Mastzelltumoren zugelassen, bei denen vor Anwendung der Substanz eine *c-KIT*-Mutation nachgewiesen wurde, was eine entsprechende molekulargenetische Untersuchung im Vorfeld notwendig werden lässt. Solche Untersuchungen scheinen auch im digitalen Mastzelltumor sinnvoll, da in unserem Tiergut ein Anteil von 12,7 % der Hunde identifiziert wurde, die Mutationsträger waren.

In kaninen Mastzelltumoren sind die Exons 8 und 9 im Vergleich zum Exon 11 seltener von Mutationen betroffen (Vozdova et al. 2020; Vozdova et al. 2019). Die beiden Exons sind dennoch von Interesse, da für *c-KIT*-Mutationen in Exon 8 beschrieben ist, dass sie im kutanen Mastzelltumor mit einer verbesserten Prognose einhergehen können (Brocks et al. 2021). Die *c-KIT* Exon 9-Mutationen werden als Gründe für Entstehung von Resistenzen gegenüber dem Kinaseinhibitor Masitinib diskutiert (Gentilini et al. 2020). In den digitalen Mastzelltumoren der Studie 2 fanden sich allerdings in keinem der beiden Exons Mutationen. An den Mastzelltumoren der Zehe ist eine Untersuchung auf Mutationen in den *c-KIT* Exons 8 und 9 für prognostische Zwecke bzw. die Einschätzung einer möglichen Masitinib-Resistenz vermutlich selten von klinischer Relevanz.

Für das Exon 14 von *c-KIT* ist in der Literatur ein Fall beschrieben, bei dem ein kaniner Mastzelltumor mit Lymphknotenmetastase eine Deletion in *c-KIT* Exon 11 und zusätzlich eine sekundäre Mutation in *c-KIT* Exon 14 aufwies (Nakano et al. 2017). Die Mutation in *c-KIT* Exon 14 verursachte in der Studie von Nakano et al. (2017) *in vitro* eine Resistenz gegenüber dem Kinaseinhibitor Imatinib. In der vorliegenden Arbeit wurde in *c-KIT* Exon 14 eine Mutation (c.2020G > A) gefunden, die einen Tausch der Aminosäure Glutaminsäure durch Lysin verursacht. Der Fall zeigte in den anderen drei Exons eine Wildtyp-Sequenz. Der weitere klinische Verlauf dieses Tieres war nicht bekannt, weshalb die Bedeutung dieser Mutation nicht weiter evaluiert werden konnte.

Französische Bulldoggen (n = 7), Labrador Retriever (n = 7), Boxer (n = 6), Golden Retriever (n = 6) und Möpse (n = 5) waren in Studie 2 besonders häufig von digitalen Mastzelltumoren betroffen. Am häufigsten vertreten waren jedoch Mischlingshunde (n = 13). Für die reinrassigen Hunde ist in der Literatur beschrieben, dass sie zwar häufig von kutanen Mastzelltumoren betroffen sind (Aupperle-Lellbach et al. 2022; Pierini et al. 2019; Śmiech et al. 2019), jedoch meistens die gut differenzierten Formen ausbilden (Śmiech et al. 2019; McNiel et al. 2006). Hinsichtlich der Prädisposition für gut differenzierte digitale Mastzelltumoren stimmten die Daten der Studie 2, bis auf die Französischen Bulldoggen, mit den Daten zu kutanen Mastzelltumoren in anderen Lokalisationen überein. Die Französischen Bulldoggen bildeten überraschenderweise einen Kontrast hierzu. Insgesamt hatten 4 von 7 (57,1 %) Französischen Bulldoggen einen digitalen Mastzelltumor, der nach dem Kiupel-System als *high-grade* und damit schlecht differenziert klassifiziert worden war. Außerdem fanden sich bei 3 von 7 (42,8 %) Französischen Bulldoggen *high-grade*-Tumoren, die eine ITD in *c-KIT* Exon 11 aufwiesen. Diese Anteile waren damit wesentlich höher als in der Gruppe der Mischlingshunde, die als Kontrollgruppe dienten. In dieser fand sich 1 Kiupel *high-grade*-Tumor und 2 Tumoren mit einer ITD in *c-KIT* Exon 11. In der Konsequenz scheint es insbesondere bei Französischen Bulldoggen sinnvoll zu sein, die anatomische



Lokalisation des Mastzelltumors differenziert zu betrachten, weil bei Mastzelltumoren in dieser Rasse nicht *per se* davon ausgegangen werden kann, dass diese gut differenziert sind, wie es die Mastzelltumoren der Zehe gezeigt haben. Somit könnte speziell diese Rasse von einer molekulargenetischen Untersuchung auf Mutationen in Exon 11 des *c-KIT*-Gens profitieren, um schlecht differenzierte digitale Mastzelltumoren, in Kombination mit einer histologischen Graduierung, identifizieren zu können. Durch den Mutationsnachweis kann außerdem die Grundlage für den Start einer Therapie mit Masitinib geschaffen werden.

Zukünftige klinische Studien könnten durch den Einbezug von Überlebenszeiten einen tieferen Einblick darüber geben, welchen prognostischen Wert die histologische Graduierung, die Immunhistologie und die molekulargenetische Analyse von *c-KIT*-Mutationen im kaninen digitalen Mastzelltumor hat.

#### **4.4 Abschließende Bewertung der molekulargenetischen Studien an kaninen digitalen Melanomen und Mastzelltumoren**

Melanome und Mastzelltumoren an der Zehe des Hundes gehören nach den Plattenepithelkarzinomen mit zu den häufigsten Zehentumoren (Grassinger et al. 2021). Obwohl das Auftreten dieser Zehentumoren regelmäßig beobachtet wird und eine entsprechende klinische Relevanz besteht, wurden sie bisher kaum erforscht. Gerade auf molekulargenetischer Ebene herrschte in der Literatur ein Mangel an Daten, der zum Verständnis dieser Zehentumoren hätte beitragen können.

In der Humanmedizin wurde im Laufe der Jahre der Begriff der „personalisierten Onkologie“ geprägt. Hiermit ist gemeint, dass eine Tumorerkrankung nicht mehr nur nach Standardprotokoll therapiert wird, sondern die molekulargenetischen Charakteristika eines Tumors sowie weitere Faktoren in eine möglichst effektive Therapiestrategie einbezogen werden (Agur et al. 2014). Als Konsequenz daraus ist es notwendig, im Vorfeld Grundlagenforschung zu betreiben, um zu verstehen, welche Genmutationen in welchen Tumoren wie häufig vorkommen und ob diese als *target* für eine pharmakologische Substanz in Frage kommen. Diesen Ansatz hat die vorliegende Arbeit aufgegriffen und sich bei der Wahl der zu untersuchenden kaninen Gene und deren Exons an dem orientiert, was im Falle der Melanome bereits für den Menschen publiziert worden ist. Für die digitalen Mastzelltumoren wurde der Fokus auf die Exons von *c-KIT* gelegt, für die bereits Daten aus anderen Lokalisationen publiziert worden waren.

Im Sinne der vergleichenden Pathologie wurde der Hund als geeignetes Modell beschrieben, um humane Neoplasien erforschen zu können, da Mensch und Hund Gemeinsamkeiten in der Entstehung von Tumoren aufweisen (Schiffman und Breen 2015). Die vorliegende Arbeit zeigte aber auch, dass der Vergleich zwischen Mensch und Hund Limitationen unterliegen

kann. Beispielsweise unterscheiden sich beide Spezies hinsichtlich der häufig mutierten *RAS*-Isoformen bei Melanomen voneinander. *BRAF*- und *c-KIT*-Mutationen sind zwar im humanen Melanom von Relevanz, im kaninen digitalen Melanom, unseren Beobachtungen nach, aber nicht. Ähnliches gilt für einen Vergleich zwischen kaninem Mastzelltumor und humaner Mastozytose. Der kanine Mastzelltumor nimmt beim Hund allein schon wegen seiner Prävalenz und Dignität einen anderen Stellenwert ein als die Mastozytose beim Menschen. In beiden Krankheitsbildern kommen *c-KIT*-Mutationen vor, jedoch ist beim Hund mit prognostischer Relevanz am häufigsten das Exon 11 betroffen, während bei der humanen Mastozytose am häufigsten das Exon 17 betroffen ist, ohne dass *c-KIT*-Mutationen mit der Überlebenszeit korrelieren (Tamlin et al. 2020). Aus diesen Gründen wurde in Studie 2 auch kein Vergleich zwischen den digitalen Mastzelltumoren des Hundes und der humanen Mastozytose angestrebt. Vielmehr lag hier der Fokus auf dem Vergleich zwischen Mastzelltumoren der Zehe des Hundes und den kaninen Mastzelltumoren in anderen kutanen Lokalisationen.

Die beiden Studien der vorliegenden Arbeit haben dazu beigetragen, digitale Melanome und Mastzelltumoren des Hundes vor allem auf molekulargenetischer Ebene besser verstehen zu können und bieten damit einen Anstoß für weitere Studien.

Es wäre von Interesse herauszufinden, welche Genmutationen in kaninen digitalen Melanomen und Mastzelltumoren noch relevant sind. Klinische Studien sind notwendig, die die Bedeutung von genetischen Mutationen weiter evaluieren. Dahingehend herrscht bei einer Vielzahl von kaninen Tumoren Forschungsbedarf. Durch die Erforschung von angeborenen Keimbahnmutationen könnte präventiv das Risiko für einzelne Tiere eingeschätzt werden, eine bestimmte Tumorerkrankung zu entwickeln. Wie in der Humanmedizin bereits etabliert, könnte durch regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen bereits präventiv gehandelt und das Entstehen eines Tumors rechtzeitig entdeckt und behandelt werden.

In Zukunft werden wahrscheinlich solche Ansätze an Bedeutung gewinnen, die in der kaninen Tumor-DNA nicht nur gezielt einzelne Gene und Loci untersuchen, sondern vielmehr eine Vielzahl von Genen gleichzeitig auf Mutationen untersuchen. In Anlehnung an die Humanmedizin könnten infolgedessen Gen-Panels entwickelt werden, die in jedem individuellen Tier zielgerichtet erworbene bzw. somatische Mutationen detektieren. Auf der Grundlage dieser Daten könnten medikamentöse Therapien eingesetzt werden, die auf die entsprechenden Mutationen als *target* ausgerichtet sind. Solche zielgerichteten Therapien wären idealerweise in der Lage, effektiv gegen eine Tumorerkrankung zu wirken und dabei das Ausmaß der unerwünschten Nebenwirkungen zu minimieren. Natürlich sind bis dahin

noch einige Hürden zu überwinden. Der Mutationsnachweis ist derzeit, gerade in der Veterinärmedizin, noch mit einem hohen Kostenaufwand verbunden, der schnell die finanziellen Kapazitäten der TierbesitzerInnen übersteigt. Auch fehlen beim Einsatz von humanmedizinischen Tumortherapien im Hund noch die entsprechenden Erfahrungswerte, die beispielsweise helfen könnten, die richtige Dosierung für das Tier einzuschätzen. Die Forschung auf diesem Gebiet steht derzeit zwar noch am Anfang, jedoch sind vielversprechende Ergebnisse zu erwarten, die die personalisierte veterinärmedizinische Onkologie vorantreiben werden.



## 5 Zusammenfassung

David Conrad

### „Histologische, immunhistologische und molekulargenetische Charakterisierung von kaninen digitalen Melanomen und Mastzelltumoren“

Kanine digitale Melanome sind auf molekulargenetischer Ebene weitestgehend unerforscht. Bei kaninen kutanen Mastzelltumoren ist bekannt, dass Mutationen im *c-KIT*-Gen prognostische und therapeutische Relevanz besitzen – jedoch existierten keine Daten darüber, ob diese Verhältnisse auch auf kanine digitale Mastzelltumoren zutreffen. Die beiden Studien der vorliegenden Arbeit haben sich deshalb auf die molekulargenetische Charakterisierung von kaninen digitalen Melanomen und Mastzelltumoren konzentriert. Außerdem wurden die beiden digitalen Tumoren histologisch ausgewertet. Im Falle der digitalen Mastzelltumoren wurden zusätzlich immunhistologische Verfahren angewendet und deren statistische Beziehung zu den histologischen Parametern und dem *c-KIT*-Mutationsstatus analysiert, um die Dignität dieses Zehentumors besser beurteilen zu können. Dafür wurden aus den Routineeinsendungen an die Laboklin GmbH & Co. KG jeweils 86 kanine digitale Melanome (2014 bis 2021; Studie 1) und 68 kanine digitale Mastzelltumoren (2014 bis 2022; Studie 2) gesammelt und die entsprechenden in Paraffin eingebetteten und in Formalin fixierten Tumorblöcke für die Studien verwendet.

Bemerkenswerterweise wurden bei den 86 kaninen digitalen Melanomen der Studie 1 in 40,7 % der Fälle *RAS*-Mutationen identifiziert. Die Mutationen verteilten sich auf die beiden untersuchten Exons von *KRAS* und *NRAS*: *KRAS* Exon 2, Codone 12 und 13 (22/86 = 25,6 %); *KRAS* Exon 3, Codon 61 (2/55 = 3,6 %); *NRAS* Exon 2, Codone 12 und 13 (2/83 = 2,4 %) und *NRAS* Exon 3, Codon 61 (9/86 = 10,5 %). Das Vorhandensein von *RAS*-Mutationen stand in keinem statistischen Zusammenhang zu den histologischen Malignitätskriterien oder dem Überleben der Hunde. Allerdings unterschieden sich der hohe Anteil an *RAS*-Mutationen und insbesondere *KRAS* als häufig von Mutationen betroffene *RAS*-Isoform deutlich von dem, was für humane Melanome und kanine orale Melanome aus der Literatur bekannt ist. Die Erkenntnis, dass *RAS*-Mutationen im kaninen digitalen Melanom häufig vorkommen, könnte von klinischer und therapeutischer Relevanz sein. Außerdem fanden sich, im Gegensatz zum humanen Melanom, in den digitalen Melanomen des Hundes weder Mutationen in *c-KIT* Exon 11 noch die kanine *BRAF* V595E-Variante, die das Pendant zu der in humanen Melanomen häufig vorkommenden *BRAF* V600E-Variante darstellt. Die Kopienzahl von *KITLG* variierte zwischen 4 und 6 – *KITLG* ist möglicherweise als Keimbahnmutation an der Entstehung von digitalen Melanomen in Hunden mit dunklen oder schwarzen Fellfarben beteiligt, was aber durch einen Mangel an Kontrolldaten vorerst

nur eine Hypothese darstellt. *KITLG* könnte daher ein Forschungsziel zur züchterischen Beeinflussung der Entstehung von kaninen digitalen Melanomen sein.

Die histologische Graduierung der 68 kaninen digitalen Mastzelltumoren nach Patnaik et al. (1984) ergab in 22,1 % der Fälle den Grad I, bei 67,6 % den Grad II und bei 10,3 % den Grad III. In der histologischen Graduierung nach Kiupel et al. (2011) fand sich in der Mehrheit der Fälle (86,8 %) der gut differenzierte Grad (*low-grade*), während die restlichen Mastzelltumoren (13,2 %) dem schlecht differenzierten Grad (*high-grade*) zugeordnet wurden. Bei der rein histologischen Beurteilung der digitalen Mastzelltumoren hätten diese zunächst in der Mehrheit als prognostisch günstig bewertet werden können. Im Kontrast dazu stand allerdings, dass 58,8 % der digitalen Mastzelltumoren ein aberrantes KIT-Muster exprimierten und 52,3 % eine erhöhte Ki-67-Antigen-Expression zeigten. Auch wenn KIT und Ki-67 keine statistische Beziehung zueinander zeigten, so fand sich dennoch eine statistische Signifikanz zwischen KIT und dem Patnaik-System ( $p = 0,027$ ) sowie zwischen Ki-67 und dem Kiupel-System ( $p = 0,03$ ). Die beiden immunhistologischen Parameter waren außerdem signifikant (KIT:  $p = 0,018$ ; Ki-67:  $p = 0,006$ ) mit internen Tandemduplikationen (ITD) in *c-KIT* Exon 11 assoziiert, welche in 12,7 % der Fälle nachweisbar waren. Französische Bulldoggen, die häufiger gut differenzierte kutane Mastzelltumoren ausbilden, waren in der vorliegenden Studie häufiger von den schlecht differenzierten Formen an der Zehe und von *c-KIT*-Mutationen in Exon 11 betroffen. Kanine digitale Mastzelltumoren haben möglicherweise ein erhöhtes malignes Potential, was insbesondere bei Französischen Bulldoggen von klinischer Relevanz sein könnte.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die differenzierte Betrachtung der Zehe als anatomische Lokalisation für Melanome und Mastzelltumoren des Hundes von Bedeutung ist, da vor allem molekulargenetische Unterschiede aufgezeigt werden konnten. Dies könnte ein Anstoß für zukünftige Studien sein, die diese Tumoren weiter erforschen und dabei den Faktor der Tumorlokalisierung mit in ihre Analysen einbeziehen.

## 6 Summary

David Conrad

### **"Histological, immunohistochemical and molecular genetic characterisation of canine digital melanomas and mast cell tumours"**

Canine digital melanomas are largely unexplored at the molecular genetic level. In canine cutaneous mast cell tumours, it is known that mutations in the *c-KIT* gene have prognostic and therapeutic relevance – however, no data existed on whether these relationships also apply to canine digital mast cell tumours. The two studies in the present work therefore focused on the molecular genetic characterisation of canine digital melanomas and mast cell tumours. In addition, these two digital tumours were evaluated histologically. For the digital mast cell tumours, immunohistochemical methods were additionally applied and their statistical relationship to the histological parameters and the *c-KIT* mutation status was analysed in order to better assess the dignity of this digital tumour. To do so, 86 canine digital melanomas (2014 to 2021; study 1) and 68 canine digital mast cell tumours (2014 to 2022; study 2) were collected from routine submissions to Laboklin GmbH & Co. KG and the corresponding formalin-fixed and paraffin-embedded tumour blocks were used.

Remarkably, in the 86 canine digital melanomas of study 1, *RAS* mutations were identified in 40.7% of the cases. Mutations were distributed between the two exons *KRAS* and *NRAS* that were analysed: *KRAS* exon 2, codons 12 and 13 (22/86 = 25.6%); *KRAS* exon 3, codon 61 (2/55 = 3.6%); *NRAS* exon 2, codons 12 and 13 (2/83 = 2.4%); and *NRAS* exon 3, codon 61 (9/86 = 10.5%). The presence of *RAS* mutations was not statistically related to histological malignancy criteria or survival. However, the high proportion of *RAS* mutations and especially *KRAS* as a *RAS* isoform frequently affected by mutations differed significantly from what is known from the literature for human melanoma and canine oral melanoma. The finding that *RAS* mutations are common in canine digital melanoma may be of clinical and therapeutic relevance. Moreover, in contrast to human melanoma, in canine digital melanomas, there were neither mutations found in *c-KIT* exon 11 nor the canine *BRAF* V595E variant, which is equivalent to the *BRAF* V600E variant frequently detected in human melanomas. The copy number of *KITLG* varied between four and six – *KITLG* may be involved as a germline mutation in the development of digital melanomas in dogs with dark or black coats, but, so far, this is only a hypothesis due to a lack of control data. *KITLG* could therefore be a research target to influence the development of canine digital melanomas through breeding.

The histological grading of the 68 canine digital mast cell tumours according to Patnaik et al. (1984) resulted in grade I in 22.1% of cases, grade II in 67.6% and grade III in 10.3%. In the histological grading according to Kiupel et al. (2011), the well-differentiated low-grade tumours were found in the majority of cases (86.8%), while the remaining mast cell tumours (13.2%) were poorly differentiated high-grade tumours. If the digital mast cell tumours had merely been assessed histologically, most of them would initially have been considered prognostically favourable. However, 58.8% of the digital mast cell tumours expressed an aberrant KIT pattern and 52.3% had increased Ki-67 antigen expression. Although KIT and Ki-67 showed no statistical relationship, there was statistical significance between KIT and the Patnaik system ( $p = 0.027$ ) as well as between Ki-67 and the Kiupel system ( $p = 0.03$ ). The two immunohistochemical parameters were also significantly associated (KIT:  $p = 0.018$ ; Ki-67:  $p = 0.006$ ) with internal tandem duplications (ITD) in *c-KIT* exon 11, which could be detected in 12.7% of cases. In the present study, French bulldogs, which are more likely to develop well-differentiated cutaneous mast cell tumours, were more frequently affected by the poorly differentiated forms at the digit and by *c-KIT* mutations in exon 11. Canine digital mast cell tumours may have an increased malignant potential, which could be of particular clinical relevance in French bulldogs.

In conclusion, the differential consideration of the digit as an anatomical site for canine melanomas and mast cell tumours is important, as molecular genetic differences in particular could be demonstrated. This could be an impetus for future studies that further investigate these tumours and thereby include the factor of tumour site in their analyses.



## 7 Literaturverzeichnis

Agur Z., Elishmereni M., Kheifetz Y. (2014):

Personalizing oncology treatments by predicting drug efficacy, side-effects, and improved therapy: mathematics, statistics, and their integration.

Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 6: 239-253. DOI: 10.1002/wsbm.1263.

Aupperle-Lellbach H., Grassinger J. M., Floren A., Törner K., Beitzinger C., Loesenbeck G., Müller T. (2022):

Tumour incidence in dogs in Germany: a retrospective analysis of 109,616 histopathological diagnoses (2014-2019).

J Comp Pathol 198: 33-55. DOI: 10.1016/j.jcpa.2022.07.009.

Aupperle-Lellbach H., Heidrich D., Kehl A., Conrad D., Brockmann M., Törner K., Beitzinger C., Müller T. (2023):

KITLG copy number germline variations in Schnauzer breeds and their relevance in digital squamous cell carcinoma in black Giant Schnauzers.

Vet Sci 10: 147. DOI: 10.3390/vetsci10020147.

Avallone G., Rasotto R., Chambers J. K., Miller A. D., Behling-Kelly E., Monti P., Berlato D., Valenti P., Roccabianca P. (2021):

Review of histological grading systems in veterinary medicine.

Vet Pathol 58: 809–828. DOI: 10.1177/0300985821999831.

Babaei M. A., Kamalidehghan B., Saleem M., Huri H. Z., Ahmadipour F. (2016):

Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells.

Drug Des Devel Ther 10: 2443-2459. DOI: 10.2147/DDDT.S89114.

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. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2003.tb14601.x.

Bannasch D. L., Affolter V. K., York D., Rebhun R. B., Grahn R. A., Weich K. M., Kallenberg A. (2021):

Correction: Weich, K., et al. Pigment intensity in dogs is associated with a copy number variant upstream of KITLG. *Genes* 2020, 11, 75.

*Genes* (Basel) 12: 357. DOI: 10.3390/genes12030357.

Beadling C., Jacobson-Dunlop E., Hodi F. S., Le C., Warrick A., Patterson J., Town A., Harlow A., Cruz F., 3rd, Azar S., Rubin B. P., Muller S., West R., Heinrich M. C., Corless C. L. (2008):

KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes.

*Clin Cancer Res* 14: 6821-6828. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0575.

Bellamy E., Berlato D. (2022):

Canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours: a narrative review.

*J Small Anim Pract* 63: 497–511. DOI: 10.1111/jsap.13444.

Blackwood L., Murphy S., Buracco P., Vos J. P. d., Fornel-Thibaud P. d., Hirschberger J., Kessler M., Pastor J., Ponce F., Savary-Bataille K., Argyle D. J. (2012):

European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats.

*Vet Comp Oncol* 10: e1-e29. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x.

Bos J. L. (1989):

Ras oncogenes in human cancer: a review.

*Cancer Res* 49: 4682-4689.

Bostock D. E. (1979):

Prognosis after surgical excision of canine melanomas.

*Vet Pathol* 16: 32-40. DOI: 10.1177/030098587901600103.

Boyle G. M., D'Souza M. M., Pierce C. J., Adams R. A., Cantor A. S., Johns J. P., Maslovskaya L., Gordon V. A., Reddell P. W., Parsons P. G. (2014):

Intra-lesional injection of the novel PKC activator EBC-46 rapidly ablates tumors in mouse models.

*PLoS One* 9: e108887. DOI: 10.1371/journal.pone.0108887.

Brocca G., Poncina B., Sammarco A., Cavicchioli L., Castagnaro M. (2020):

KIT somatic mutations and immunohistochemical expression in canine oral melanoma.

Animals (Basel) 10: 2370. DOI: 10.3390/ani10122370.

Brocks B. A. W., Bertram C. A., Bartel A., Kirpensteijn J., Collins-Webb A., Catlin C., Thaiwong T., Kiupel M. (2021):

Internal tandem duplication of exon 8 of c-kit is associated with longer total survival in canine cutaneous mast cell tumors.

Vet Pathol 58: 315–324. DOI: 10.1177/0300985820973463.

Brose M. S., Volpe P., Feldman M., Kumar M., Rishi I., Gerrero R., Einhorn E., Herlyn M., Minna J., Nicholson A., Roth J. A., Albelda S. M., Davies H., Cox C., Brignell G., Stephens P., Futreal P. A., Wooster R., Stratton M. R., Weber B. L. (2002):

BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma.

Cancer Res 62: 6997-7000.

Camus M. S., Priest H. L., Koehler J. W., Driskell E. A., Rakich P. M., Ilha M. R., Krimer P. M. (2016):

Cytologic criteria for mast cell tumor grading in dogs with evaluation of clinical outcome.

Vet Pathol 53: 1117–1123. DOI: 10.1177/0300985816638721.

Chu P. Y., Pan S. L., Liu C. H., Lee J., Yeh L. S., Liao A. T. (2013):

KIT gene exon 11 mutations in canine malignant melanoma.

Vet J 196: 226-230. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.09.005.

Cicenas J., Tamosaitis L., Kvederaviciute K., Tarvydas R., Staniute G., Kalyan K., Meskinyte-Kausiliene E., Stankevicius V., Valius M. (2017):

KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma.

Med Oncol 34: 26. DOI: 10.1007/s12032-016-0879-9.

Cruz V. S., Borges J. C. A., Nepomuceno L. L., Gonçalves P. A. M., Prado Y. C. L., Bianchi C., Fioravanti M. C. S., Araújo E. G. (2020):

Histological classification and expression of markers of canine mast cell tumors.

Vet World 13: 1627–1634. DOI: 10.14202/vetworld.2020.1627-1634.

Das S., Idate R., Cronise K. E., Gustafson D. L., Duval D. L. (2019):

Identifying candidate druggable targets in canine cancer cell lines using whole-exome sequencing.

Mol Cancer Ther 18: 1460-1471. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-18-1346.

Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M. J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B. A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G. J., Bigner D. D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J. W., Leung S. Y., Yuen S. T., Weber B. L., Seigler H. F., Darrow T. L., Paterson H., Marais R., Marshall C. J., Wooster R., Stratton M. R., Futreal P. A. (2002):

Mutations of the BRAF gene in human cancer.

Nature 417: 949-954. DOI: 10.1038/nature00766.

Dhillon A. S., Hagan S., Rath O., Kolch W. (2007):

MAP kinase signalling pathways in cancer.

Oncogene 26: 3279-3290. DOI: 10.1038/sj.onc.1210421.

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. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2007.00366.x.

Domingues B., Lopes J. M., Soares P., Populo H. (2018):

Melanoma treatment in review.

Immunotargets Ther 7: 35-49. DOI: 10.2147/ITT.S134842.

Downward J. (2003):

Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy.

Nat Rev Cancer 3: 11-22. DOI: 10.1038/nrc969.

Escobar H. M., Gunther K., Richter A., Soller J. T., Winkler S., Nolte I., Bullerdiek J. (2004):

Absence of ras-gene hot-spot mutations in canine fibrosarcomas and melanomas.

Anticancer Res 24: 3027-3028.

Fowles J. S., Denton C. L., Gustafson D. L. (2015):

Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma.

Vet Comp Oncol 13: 288-304. DOI: 10.1111/vco.12044.

Freytag J. O., Queiroz M. R., Govoni V. M., Pereira I. V. A., Pulz L. H., Francisco Strefezzi R. d., Queiroga F. L., Cogliati B. (2021):

Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumours: a systematic review and meta-analysis.

Vet Comp Oncol 19: 529–540. DOI: 10.1111/vco.12692.

Frost M. J., Ferrao P. T., Hughes T. P., Ashman L. K. (2002):

Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant.

Mol Cancer Ther 1: 1115-1124.

Garcia-Montero A. C., Jara-Acevedo M., Teodosio C., Sanchez M. L., Nunez R., Prados A., Aldanondo I., Sanchez L., Dominguez M., Botana L. M., Sanchez-Jimenez F., Sotlar K., Almeida J., Escribano L., Orfao A. (2006):

KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients.

Blood 108: 2366–2372. DOI: 10.1182/blood-2006-04-015545.

Gasser K. (2022):

[Successful local treatment of a digital canine mast cell tumour with Tigilanol Tiglate].

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 50: 225–231. DOI: 10.1055/a-1844-8554.

Gentilini F., Turba M. E., Dally C., Takanosu M., Kurita S., Bonkobara M. (2020):

The secondary KIT mutation p.Ala510Val in a cutaneous mast cell tumour carrying the activating mutation p.Asn508Ile confers resistance to masitinib in dogs.

BMC Vet Res 16: 64. DOI: 10.1186/s12917-020-02284-9.

Gillard M., Cadieu E., De Brito C., Abadie J., Vergier B., Devauchelle P., Degorce F., Dreano S., Primot A., Dorso L., Lagadic M., Galibert F., Hedan B., Galibert M. D., Andre C. (2014):

Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas.

Pigment Cell Melanoma Res 27: 90-102. DOI: 10.1111/pcmr.12170.

Goel V. K., Lazar A. J., Warneke C. L., Redston M. S., Haluska F. G. (2006):

Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma.

J Invest Dermatol 126: 154-160. DOI: 10.1038/sj.jid.5700026.

Goldschmidt M. H., Goldschmidt K. H. (2017):

Epithelial and melanocytic tumors of the skin.

In: Tumors in Domestic Animals. D. J. Meuten. Fifth Edition. Ames, Iowa, John Wiley et Sons Inc: 88–141. ISBN: 9780813821795.

Grassinger J. M., Floren A., Müller T., Cerezo-Echevarria A., Beitzinger C., Conrad D., Törner K., Staudacher M., Aupperle-Lellbach H. (2021):

Digital lesions in dogs: a statistical breed analysis of 2912 cases.

Vet Sci 8: 136. DOI: 10.3390/vetsci8070136.

Hahn K. A., Ogilvie G., Oglivie 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. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.0190.x.

Hendricks W. P. D., Zismann V., Sivaprakasam K., Legendre C., Poorman K., Tembe W., Perdignes N., Kiefer J., Liang W., DeLuca V., Stark M., Ruhe A., Froman R., Duesbery N. S., Washington M., Aldrich J., Neff M. W., Huentelman M. J., Hayward N., Brown K., Thamm D., Post G., Khanna C., Davis B., Breen M., Sekulic A., Trent J. M. (2018):

Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis.

PLoS Genet 14: e1007589. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007589.

Henry C. J., Brewer W. G., Jr., Whitley E. M., Tyler J. W., Ogilvie G. K., Norris A., Fox L. E., Morrison W. B., Hammer A., Vail D. M., Berg J., Veterinary Cooperative Oncology G. (2005):

Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs.

J Vet Intern Med 19: 720-724. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2005.tb02751.x.

Hewicker-Trautwein M., Gruber A. D., Wohlsein P. (2012):

Tumoren.

In: Pathohistologie für die Tiermedizin. W. Baumgärtner. 2. Auflage. Stuttgart, Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co KG. 2. 24-83. ISBN: 978-3-8304-1144-4.

Horta R. D. S., Giuliano A., Lavalle G. E., Costa M. d. P., Araújo R. B. d., Constantino-Casas F., Dobson J. M. (2018a):

Clinical, histological, immunohistochemical and genetic factors associated with measurable response of high-risk canine mast cell tumours to tyrosine kinase inhibitors.

Oncol Lett 15: 129–136. DOI: 10.3892/ol.2017.7323.

Horta R. S., Lavalle G. E., Monteiro L. N., Souza M. C. C., Cassali G. D., Araújo R. B. (2018b):

Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features.

Vet Pathol 55: 212–223. DOI: 10.1177/0300985817747325.

Isotani M., Ishida N., Tominaga M., Tamura K., Yagihara H., Ochi S., Kato R., Kobayashi T., Fujita M., Fujino Y., Setoguchi A., Ono K., Washizu T., Bonkobara M. (2008):

Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs.

J Vet Intern Med 22: 985-988. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.00132.x.

Isotani M., Yamada O., Lachowicz J. L., Tamura K., Yagihara H., Fujino Y., Ono K., Washizu T., Bonkobara M. (2010):

Mutations in the fifth immunoglobulin-like domain of kit are common and potentially sensitive to imatinib mesylate in feline mast cell tumours.

Br J Haematol 148: 144-153. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07926.x.

Karyadi D. M., Karlins E., Decker B., vonHoldt B. M., Carpintero-Ramirez G., Parker H. G., Wayne R. K., Ostrander E. A. (2013):

A copy number variant at the KITLG locus likely confers risk for canine squamous cell carcinoma of the digit.

PLoS Genet 9: e1003409. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003409.

Kiupel M. (2017):

Mast cell tumors.

In: Tumors in domestic animals. D. J. Meuten. Fifth Edition. Ames, Iowa, John Wiley et Sons Inc: 176-202. ISBN: 9780813821795.



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., W Snyder P., 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. DOI: 10.1177/0300985810386469.

Kiupel M., Webster J. D., 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. DOI: 10.1354/vp.41-4-371.

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. DOI: 10.1186/1746-6148-8-96.

Letard S., Yang Y., Hanssens K., Palmérini F., Leventhal P. S., Guéry 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. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0067.

Lim K.-H., Tefferi A., Lasho T. L., Finke C., Patnaik M., Butterfield J. H., McClure R. F., Li C.-Y., Pardanani A. (2009):

Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors.

Blood 113: 5727–5736. DOI: 10.1182/blood-2009-02-205237.

London C. A. (2009):

Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine.

Top Companion Anim Med 24: 106–112. DOI: 10.1053/j.tcam.2009.02.002.

London C. A., Malpas P. B., Wood-Follis S. L., Boucher J. F., Rusk A. W., Rosenberg M. P., Henry C. J., Mitchener K. L., Klein M. K., Hintermeister J. G., Bergman P. J., Couto G. C., Mauldin G. N., Michels G. M. (2009):

Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision.

Clin Cancer Res 15: 3856–3865. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-08-1860.

Lyu J., Song Z., Chen J., Shepard M. J., Song H., Ren G., Li Z., Guo W., Zhuang Z., Shi Y. (2018):

Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets.

J Pathol 244: 358-366. DOI: 10.1002/path.5017.

Manley C. A., Leibman N. F., Wolchok J. D., Rivière I. C., Bartido S., Craft D. M., Bergman P. J. (2011):

Xenogeneic murine tyrosinase DNA vaccine for malignant melanoma of the digit of dogs.

J Vet Intern Med 25: 94-99. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0627.x.

Marino D. J., Matthiesen D. T., Stefanacci J. D., Moroff S. D. (1995):

Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991).

J Am Vet Med Assoc 207: 726-728.

Mayr B., Schaffner G., Reifinger M., Zwetkoff S., Prodinger B. (2003):

N-ras mutations in canine malignant melanomas.

Vet J 165: 169-171. DOI: 10.1016/s1090-0233(02)00245-9.

McNiel E. A., Prink A. L., O'Brien T. D. (2006):

Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs.

Vet Comp Oncol 4: 2–8. DOI: 10.1111/j.1476-5810.2006.00085.x.

Meuten D. J., Moore F. M., Donovan T. A., Bertram C. A., Klopfleisch R., Foster R. A., Smedley R. C., Dark M. J., Milovancev M., Stromberg P., Williams B. H., Aubreville M., Avallone G., Bolfa P., Cullen J., Dennis M. M., Goldschmidt M., Luong R., Miller A. D., Miller M. A., Munday J. S., Roccabianca P., Salas E. N., Schulman F. Y., Laufer-Amorim R., Asakawa M. G., Craig L., Dervisis N., Esplin D. G., George J. W., Hauck M., Kagawa Y., Kiupel M., Linder K., Meichner K., Marconato L., Oblak M. L., Santos R. L., Simpson R. M., Tvedten H., Whitley D. (2021):

International guidelines for veterinary tumor pathology: a call to action.

Vet Pathol 58: 766–794. DOI: 10.1177/03009858211013712.

Mochizuki H., Breen M. (2015):

Comparative aspects of BRAF mutations in canine cancers.

Vet Sci 2: 231-245. DOI: 10.3390/vetsci2030231.

Mochizuki H., Breen M. (2017):

Sequence analysis of RAS and RAF mutation hot spots in canine carcinoma.

Vet Comp Oncol 15: 1598-1605. DOI: 10.1111/vco.12275.

Mochizuki H., Kennedy K., Shapiro S. G., Breen M. (2015):

BRAF mutations in canine cancers.

PLoS One 10: e0129534. DOI: 10.1371/journal.pone.0129534.

Mochizuki H., Thomas R., Moroff S., Breen M. (2017):

Genomic profiling of canine mast cell tumors identifies DNA copy number aberrations associated with KIT mutations and high histological grade.

Chromosome Res 25: 129–143. DOI: 10.1007/s10577-016-9543-7.

Murakami A., Mori T., Sakai H., Murakami M., Yanai T., Hoshino Y., Maruo K. (2011):

Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas.

Vet Comp Oncol 9: 219-224. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2010.00253.x.

Nakano Y., Kobayashi M., Bonkobara M., Takanosu M. (2017):

Identification of a secondary mutation in the KIT kinase domain correlated with imatinib-resistance in a canine mast cell tumor.

Vet Immunol Immunopathol 188: 84–88. DOI: 10.1016/j.vetimm.2017.05.004.

Nardi A. B. d., Dos Santos Horta R., Fonseca-Alves C. E., Paiva F. N. d., Linhares L. C. M., Firmo B. F., Ruiz Sueiro F. A., Oliveira K. D. d., Lourenço S. V., Francisco Strefezzi R. d., Brunner C. H. M., Rangel M. M. M., Jark P. C., Castro J. L. C., Ubukata R., Batschinski K., Sobral R. A., da Cruz N. O., Nishiya A. T., Fernandes S. C., Dos Santos Cunha S. C., Gerardi D. G., Challoub G. S. G., Biondi L. R., Laufer-Amorim R., Oliveira Paes P. R. d., Lavallo G. E., Huppel R. R., Grandi F., Carvalho Vasconcellos C. H. d., Dos Anjos D. S., Luzo Â. C. M., Matera J. M., Vozdova M., Dagli M. L. Z. (2022):

Diagnosis, prognosis and treatment of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors.

Cells 11: 618. DOI: 10.3390/cells11040618.

Nishiya A. T., Massoco C. O., Felizzola C. R., Perlmann E., Batschinski K., Tedardi M. V., Garcia J. S., Mendonca P. P., Teixeira T. F., Zaidan Dagli M. L. (2016):

Comparative aspects of canine melanoma.

Vet Sci 3: 7. DOI: 10.3390/vetsci3010007.

Northrup N. C., Harmon B. G., Gieger T. L., Brown C. A., Carmichael K. P., Garcia A., Latimer K. S., Munday J. S., Rakich P. M., Richey L. J., Stedman N. L., Cheng A.-L., Howerth E. W. (2005):

Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors.

J Vet Diagn Invest 17: 245–248. DOI: 10.1177/104063870501700305.

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. DOI: 10.1177/030098588402100503.

Pham D. D. M., Guhan S., Tsao H. (2020):

KIT and melanoma: biological insights and clinical implications.

Yonsei Med J 61: 562-571. DOI: 10.3349/ymj.2020.61.7.562.

Pierini A., Lubas G., Gori E., Binanti D., Millanta F., Marchetti V. (2019):

Epidemiology of breed-related mast cell tumour occurrence and prognostic significance of clinical features in a defined population of dogs in west-central Italy.

Vet Sci 6: 53. DOI: 10.3390/vetsci6020053.

Prouteau A., Andre C. (2019):

Canine melanomas as models for human melanomas: clinical, histological, and genetic comparison.

Genes (Basel) 10: 501. DOI: 10.3390/genes10070501.

Reynolds B. D., Thomson M. J., O'Connell K., Morgan E. J., Gummow B. (2019):

Patient and tumour factors influencing canine mast cell tumour histological grade and mitotic index.

Vet Comp Oncol 17: 338–344. DOI: 10.1111/vco.12477.

Romansik E. M., Reilly C. M., Kass P. H., Moore P. F., London C. A. (2007):

Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors.

Vet Pathol 44: 335–341. DOI: 10.1354/vp.44-3-335.

Sabattini S., Barzon G., Giantin M., Lopparelli R. M., Dacasto M., Prata D., Bettini G. (2017):

Kit receptor tyrosine kinase dysregulations in feline splenic mast cell tumours.

Vet Comp Oncol 15: 1051-1061. DOI: 10.1111/vco.12246.

Savoia P., Fava P., Casoni F., Cremona O. (2019):

Targeting the ERK signaling pathway in melanoma.

Int J Mol Sci 20: 1483. DOI: 10.3390/ijms20061483.

Schiffman J. D., Breen M. (2015):

Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 370: 20140231. DOI: 10.1098/rstb.2014.0231.

Scholzen T., Gerdes J. (2000):

The Ki-67 protein: from the known and the unknown.

J Cell Physiol 182: 311–322. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.

Schultheiss P. C. (2006):

Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs.

J Vet Diagn Invest 18: 422-425. DOI: 10.1177/104063870601800422.

Selmic L. E., Ruple A. (2020):

A systematic review of surgical margins utilized for removal of cutaneous mast cell tumors in dogs.

BMC Vet Res 16: 5. DOI: 10.1186/s12917-019-2227-8.

Seung B.-J., Cho S.-H., Kim S.-H., Bae M.-K., Lim H.-Y., Sur J.-H. (2021):

In situ c-KIT mRNA quantification of canine cutaneous mast cell tumours and its relationship to prognostic factors.

Vet Comp Oncol 19: 132–139. DOI: 10.1111/vco.12650.

Shelly S., Chien M. B., Yip B., Kent M. S., Theon A. P., McCallan J. L., London C. A. (2005):

Exon 15 BRAF mutations are uncommon in canine oral malignant melanomas.

Mamm Genome 16: 211-217. DOI: 10.1007/s00335-004-2441-x.

Smedley R. C., Thaiwong T., Deeth L. E., Kiupel M. (2021):

Correlation between KIT expression and c-Kit mutations in 2 subtypes of canine oral melanocytic neoplasms.

Vet Pathol 58: 683-691. DOI: 10.1177/03009858211009784.

Śmiech A., Łopuszyński W., Ślaska B., Bulak K., Jasik A. (2019):

Occurrence and distribution of canine cutaneous mast cell tumour characteristics among predisposed breeds.

J Vet Res 63: 141–148. DOI: 10.2478/jvetres-2019-0002.

Smith S. H., Goldschmidt M. H., McManus P. M. (2002):

A comparative review of melanocytic neoplasms.

Vet Pathol 39: 651-678. DOI: 10.1354/vp.39-6-651.

Spangler W. L., Kass P. H. (2006):

The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia.

Vet Pathol 43: 136-149. DOI: 10.1354/vp.43-2-136.

Stanclift R. M., Gilson S. D. (2008):

Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs.

J Am Vet Med Assoc 232: 53–62. DOI: 10.2460/javma.232.1.53.

Stefanello D., Buracco P., Sabattini S., Finotello R., Giudice C., Grieco V., Iussich S., Tursi M., Scase T., Di Palma S., Bettini G., Ferrari R., Martano M., Gattino F., Marrington M., Mazzola M., Elisabetta Vasconi M., Annoni M., Marconato L. (2015):

Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009-2014).

J Am Vet Med Assoc 246: 765–769. DOI: 10.2460/javma.246.7.765.

Takeuchi Y., Fujino Y., Watanabe M., Takahashi M., Nakagawa T., Takeuchi A., Bonkobara M., Kobayashi T., Ohno K., Uchida K., Asano K., Nishimura R., Nakayama H., Sugano S., Ohashi Y., Tsujimoto H. (2013):

Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study.

Vet J 196: 492–498. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.11.018.

Tamlin V. S., Bottema C. D. K., Peaston A. E. (2020):

Comparative aspects of mast cell neoplasia in animals and the role of KIT in prognosis and treatment.

Vet Med Sci 6: 3–18. DOI: 10.1002/vms3.201.

Tamlin V. S., Bottema C. D. K., Woolford L., Dobson E. C., Kessell A. E., Peaston A. E. (2022):

Canine mast cell tumours part I: clinical and survival outcomes.

Vet Med Sci 8: 1409–1420. DOI: 10.1002/vms3.812.

Thompson J. J., Morrison J. A., Pearl D. L., Boston S. E., Wood G. A., Foster R. A., Coomber B. L. (2016):

Receptor tyrosine kinase expression profiles in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors.

Vet Pathol 53: 545–558. DOI: 10.1177/0300985815610388.

Tsao H., Goel V., Wu H., Yang G., Haluska F. G. (2004):

Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma.

J Invest Dermatol 122: 337-341. DOI: 10.1046/j.0022-202X.2004.22243.x.

Vozdova M., Kubickova S., Fictum P., Cernohorska H., Fröhlich J., Rubes J. (2020):

Mutation and methylation status of KIT and TP53 in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours.

Vet Comp Oncol 18: 438–444. DOI: 10.1111/vco.12543.



Vozdova M., Kubickova S., Fictum P., Fröhlich J., Jelinek F., Rubes J. (2019):

Prevalence and prognostic value of c-kit and TP53 mutations in canine mast cell tumours.

Vet J 247: 71–74. DOI: 10.1016/j.tvjl.2019.03.005.

Wagener C., Müller O. (2010):

Signalwege der Tumorentstehung.

In: Molekulare Onkologie. 3. Auflage. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: 200-282. ISBN: 978-3-13-103513-4.

Warland J., Dobson J. (2013):

Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom.

Vet J 197: 496–498. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.02.017.

Webster J. D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Kaneene J. B., Miller R., Resau J. H., Kiupel M. (2006):

The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors.

Neoplasia 8: 104–111. DOI: 10.1593/neo.05622.

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. DOI: 10.1354/vp.44-3-298.

Wei B. R., Hoover S. B., Peer C. J., Dwyer J. E., Adissu H. A., Shankarappa P., Yang H., Lee M., Peat T. J., Figg W. D., Simpson R. M. (2020):

Efficacy, tolerability, and pharmacokinetics of combined targeted MEK and dual mTORC1/2 inhibition in a preclinical model of mucosal melanoma.

Mol Cancer Ther 19: 2308-2318. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0858.

Wei B. R., Michael H. T., Halsey C. H., Peer C. J., Adhikari A., Dwyer J. E., Hoover S. B., El Meskini R., Kozlov S., Weaver Ohler Z., Figg W. D., Merlino G., Simpson R. M. (2016):

Synergistic targeted inhibition of MEK and dual PI3K/mTOR diminishes viability and inhibits tumor growth of canine melanoma underscoring its utility as a preclinical model for human mucosal melanoma.

Pigment Cell Melanoma Res 29: 643-655. DOI: 10.1111/pcmr.12512.

Welle M. M., Bley C. R., Howard J., Rüfenacht S. (2008):

Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment.

Vet Dermatol 19: 321–339. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2008.00694.x.

Wobeser B. K., Kidney B. A., Powers B. E., Withrow S. J., Mayer M. N., Spinato M. T., Allen A. L. (2007):

Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories.

Vet Pathol 44: 355-361. DOI: 10.1354/vp.44-3-355.

Wong C. W., Fan Y. S., Chan T. L., Chan A. S., Ho L. C., Ma T. K., Yuen S. T., Leung S. Y., Cancer Genome P. (2005):

BRAF and NRAS mutations are uncommon in melanomas arising in diverse internal organs.

J Clin Pathol 58: 640-644. DOI: 10.1136/jcp.2004.022509.

Wong K., van der Weyden L., Schott C. R., Foote A., Constantino-Casas F., Smith S., Dobson J. M., Murchison E. P., Wu H., Yeh I., Fullen D. R., Joseph N., Bastian B. C., Patel R. M., Martincorena I., Robles-Espinoza C. D., Iyer V., Kuijjer M. L., Arends M. J., Brenn T., Harms P. W., Wood G. A., Adams D. J. (2019):

Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma.

Nat Commun 10: 353. DOI: 10.1038/s41467-018-08081-1.

Yang Z., Shi H., Ma P., Zhao S., Kong Q., Bian T., Gong C., Zhao Q., Liu Y., Qi X., Zhang X., Han Y., Liu J., Li Q., Chen H., Su B. (2018):

Darwinian positive selection on the pleiotropic effects of KITLG explain skin pigmentation and winter temperature adaptation in Eurasians.

Mol Biol Evol 35: 2272-2283. DOI: 10.1093/molbev/msy136.

Yeh I., Jorgenson E., Shen L., Xu M., North J. P., Shain A. H., Reuss D., Wu H., Robinson W. A., Olshen A., Von Deimling A., Kwok P.-Y., Bastian B. C., Asgari M. M. (2019):

Targeted genomic profiling of acral melanoma.

J Natl Cancer Inst 111: 1068-1077. DOI: 10.1093/jnci/djz005.

Zaman A., Wu W., Bivona T. G. (2019):

Targeting oncogenic BRAF: past, present, and future.

Cancers (Basel) 11: 1197. DOI: 10.3390/cancers11081197.

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. DOI: 10.1354/vp.39-5-529.



## 8 Publikationsverzeichnis

### 8.1 Erstautorenschaft

Conrad D., Kehl A., Beitzinger C., Metzler T., Steiger K., Pfarr N., Fischer K., Klopfleisch R., Aupperle-Lellbach H. (2022): Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs. *Vet Sci* 9: 56. DOI: 10.3390/vetsci9020056.

Conrad D., Kehl A., Müller T., Klopfleisch R., Aupperle-Lellbach H. (2023): Immunohistochemical and Molecular Genetic Analysis of Canine Digital Mast Cell Tumours. *Animals* 13: 1694. DOI: 10.3390/ani13101694.

### 8.2 Ko-Autorenschaft

Grassinger J. M., Floren A., Müller T., Cerezo-Echevarria A., Beitzinger C., Conrad D., Törner K., Staudacher M., Aupperle-Lellbach H. (2021): Digital Lesions in Dogs: A Statistical Breed Analysis of 2912 Cases. *Vet Sci* 8: 136. DOI: 10.3390/vetsci8070136.

Kehl A., Törner K., Jordan A., Lorenz M., Schwittlick U., Conrad D., Steiger K., Schusser B., Aupperle-Lellbach H. (2022): Pathological Findings in Gastrointestinal Neoplasms and Polyps in 860 Cats and a Pilot Study on miRNA Analyses. *Vet Sci* 9: 477. DOI: 10.3390/vetsci9090477.

Aupperle-Lellbach H., Heidrich D., Kehl A., Conrad D., Brockmann M., Törner K., Beitzinger C., Müller T. (2023): KITLG Copy Number Germline Variations in Schnauzer Breeds and Their Relevance in Digital Squamous Cell Carcinoma in Black Giant Schnauzers. *Vet Sci* 10: 147. DOI: 10.3390/vetsci10020147.

Aupperle-Lellbach H., Heidrich D., Conrad D., Beitzinger C., Masala N., Klopfleisch R., Müller T. (2023): Comparative Study of Digital Squamous Cell Carcinoma in Giant, Standard, and Miniature Schnauzers. *Animals* 13: 1990. DOI: 10.3390/ani13121990.

### 8.3 Poster

Grassinger J. M., Conrad D., Törner K., Cerezo-Echevarria A., Floren A., Müller T., Aupperle-Lellbach H. (2021): Tumoren der Zehe des Hundes – Gibt es weniger betroffene Rassen? DGK-DVG, 18.-20.11.2021 in Berlin, Deutschland, Congress abstracts, S. 195.

Conrad D., Kehl A., Beitzinger C., Metzler T., Steiger K., Pfarr N., Fischer K., Klopfleisch R., Aupperle-Lellbach H. (2022): RAS-Mutationen in den akralen Melanomen des Hundes. DGK-DVG, 13.-15.10.2022 in Berlin, Deutschland, Congress abstracts, S. 17.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Robert Klopffleisch danke ich für die fachliche Expertise und die stets freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Frau PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach sei an dieser Stelle ganz besonders gedankt. Heike, Du hast mich von Anfang an unterstützt und mir in kurzer Zeit so viel beigebracht und mich gefördert, dass ein paar Zeilen dem nicht gerecht werden würden. Du warst die beste Betreuerin, die ich mir hätte wünschen können. Ich danke Dir vielmals!

Frau Dr. Elisabeth Müller danke ich für die Möglichkeit, dass ich bei Laboklin arbeiten und dort meine Dissertation anfertigen durfte.

Ich danke Frau Alexandra Kehl, dem gesamten pathologischen Team der TUM, sowie den Laboklin-LaborantInnen für ihre Hilfe und Unterstützung.

Frau Doreen Girndt danke ich für die beeindruckende sprachliche Expertise, die mit in die Erstellung der Publikationen einfluss.

Ich danke meinen KollegInnen von Laboklin aus der klinischen Labordiagnostik – wegen Euch kam ich immer gerne zur Arbeit! Mein Dank geht an der Stelle auch an Frau Dr. Ruth Klein, die mir dabei geholfen hat, Dienste und Promotion unter einen Hut zu bekommen.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die Unterstützung, die offenen Ohren und den Zuspruch, wenn es gerade mal nicht so rosig aussah.

Auch bedanken möchte ich mich bei Uli, der mich ebenfalls von Anfang an unterstützt hat und gar nicht abwarten konnte, dass ich fertig werde.

Zu guter Letzt danke ich Dir, Anne. Deine grenzenlose Unterstützung war und ist einfach unbezahlbar!

## **10 Finanzierungsquellen**

Im Rahmen meiner eigenen Untersuchungen wurden beide Studien finanziell unterstützt durch die Bayerische Forschungstiftung mit dem Forschungsverbund Tumordiagnostik für individualisierte Therapie – FORTiTher, TP-4.

## **11 Erklärung zu Interessenskonflikten**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenkonflikte durch Zuwendungen Dritter. Die genannte Finanzierungsquelle hatte keinen Einfluss auf den Entwurf der Studien, die Sammlung, Auswertung und Interpretation der Daten, das Schreiben der Publikation und die Entscheidung zur Publikation der Ergebnisse. Ich, David Conrad, arbeitete bei der Laboklin GmbH & Co. KG und mein ehemaliger Arbeitgeber bietet die histopathologischen, immunhistologischen und molekulargenetischen Untersuchungen kommerziell an.



## **12 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 09.11.2023

David Conrad











9 783967 292312

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-231-2