

Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Institut für Tierpathologie

Identifikation molekularer Karzinogenesefaktoren und diagnostischer Marker häufiger Tumorarten beim Hund

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Eingereicht von
Dr. med. vet. Robert Klopfleisch
Berlin

Berlin 2013

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin.

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Mammatumor, Milchdrüsentumor, Mastzelltumor, peripherer Nervenscheidentumor, Molekularonkologie, Hund, Brustkrebs, Transkriptom, Proteom, Biomarker, Karzinogenese, FFPE, Formalin-Fixierung, Biopsie

Tag des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrags: 18.12.2013

Meiner Familie

Inhalt

Abkürzungen	II
1 Einleitung	1
1.1 Gesamtliste der Publikationen dieser kumulativen Habilitationsschrift (<i>Publikationen 1-35</i>)	3
2 Kanine Milchdrüsentumoren	13
2.1 Offene Fragen (Publikationen 1-2)	13
2.2 Metastasierungs-assoziierte Genexpression	16
2.3 Komplexe Malignitäts-assoziierte mRNA- und Proteinexpressionsmuster.....	20
2.4 Zirkulierende Tumorzellen als Metastasierungsmarker.....	22
2.5 Reflexion der malignen Progression im Proteom	24
2.6 Eigene Publikationen zu Milchdrüsentumoren im Rahmen dieser kumulativen Habilitation (<i>Publikationen 1-22</i>)	26
3 Kanine Mastzelltumoren	29
3.1 Offene Fragen	29
3.2 Tumorgrad- und KIT-Mutations-abhängige Proteinexpression.....	31
3.3 Der Interleukin-2-Rezeptor als Malignitätsmarker	32
3.4 Zielgene des KIT-Rezeptors in neoplastischen Mastzellen.....	33
3.5 Eigene Publikationen zu Mastzelltumoren im Rahmen dieser kumulativen Habilitationsschrift (<i>Publikationen 23-30</i>)	34
4 Kanine kutane Weichgewebssarkome	37
4.1 Offene Fragen	37
4.2 Differentielle mRNA-Expressionsmuster bei peripheren Nervenscheidentumoren versus Fibrosarkomen	38
4.3 Eigene Publikationen zu kaninen kutanen Weichgewebssarkomen im Rahmen dieser kumulativen Habilitationsschrift (<i>Publikationen 31-33</i>)	39
5 Übergreifende Diskussion	41
5.1 Eigene Publikationen zum Risiko der Entnahme von Tumorbiopsien und der Entwicklung der personalisierten Tiermedizin (<i>Publikationen 34-35</i>).....	44
6 Zusammenfassung	45
7 Summary	47
8 Literatur	49
9 Danksagung	53

Abkürzungen

2D-DIGE	2-Dimensionale Differenzielle Gelelektrophorese
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BRCA 1 / 2	Breast Cancer Associated Genes 1 / 2
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EEF1D	Eukaryotic Elongation Factor 1 Delta
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
HEPACAM	Hepatocyte Cell Adhesion Molecule
IGF	Insulin Like Growth Factor
IGFR	Insulin Like Growth Factor Receptor
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
Ki67	Antigen Identified by Monoclonal Antibody Mib
IL-2	Interleukin 2
IL-2R	Interleukin 2-Rezeptor
LTBP	Latent Transforming Growth Factor Binding Protein
miRNA	MicroRNA
p21	Protein 21
p27	Protein 27
p53	Protein 53
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PNST	Peripherer Nervenscheidentumor
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RAD51	Radiation Induced Protein 51
(m)RNA	(messenger)Ribonucleic Acid
snoRNA	Small Nucleolar RNA
TGFB	Transforming Growth Factor Beta
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Wie beim Menschen stellen auch beim älteren Hund neoplastische Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen dar (Lana 2007). Dabei zeigen insbesondere die Fortschritte im humanen *Tumor Genome Project*, dass Tumorarten, welche bisher diagnostisch und therapeutisch als einheitlich angesehen wurden, in therapeutisch und prognostisch relevante Untergruppen unterteilt werden können oder sogar so verschieden wie die betroffenen Patienten selbst sein können (Stephens 2012). Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin gibt es deshalb zunehmend die Bestrebungen eine möglichst individuelle Diagnose, Prognose und Therapie im Rahmen einer „personalisierten Medizin“ zu etablieren. Momentan zeigen sich erste, kleine Schritte auf diesem Weg hin zu einer „personalisierten Veterinärmedizin“ unter der Verwendung von neuartigen diagnostischen Ansätzen wie *Minimal Residual Disease* und *Circulating Tumor Cells* (Sato 2012). Als Hindernisse auf dem Weg zu einer möglichst individuellen Therapie von Hunden mit Tumorerkrankungen sind jedoch vor allem die bisher begrenzten Kenntnisse über die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung kaniner Tumoren zu nennen. Damit einhergehend findet sich auch ein Mangel an klinisch relevanten, diagnostischen Markern und innovativen, therapeutischen Ansätzen, welche im Sinne einer evidenzbasierten Medizin gezielt an den molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und -proliferation angreifen.

Tumorerkrankungen führen häufig unter anderem durch lokal invasives Wachstum mit daraus folgender Funktionsstörung des Ursprungsgewebes oder von Organen in der unmittelbaren Umgebung zum Tod. Weiterhin zeigen eine Vielzahl von kaninen Tumorarten auch eine Metastasierung in regionäre Lymphknoten und darüber hinaus in entfernte Organe und führen dort ebenfalls zu einer Funktionsbeeinträchtigung durch expansives oder destruktiv infiltratives Wachstum (Brodey 1983). Über die molekularen Mechanismen der Entstehung maligner Tumoren mit der Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung ist jedoch allgemein und insbesondere bei Tieren relativ wenig bekannt. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass es zunächst zu einer unregelmäßigen monoklonalen oder polyklonalen Proliferation von Tumorzellen aufgrund von Mutationen oder epigenetischen Veränderungen in einer somatischen Tumourursprungszelle kommt. Zwei dominierende Theorien versuchen die initiale Phase der Entstehung und Weiterentwicklung dieser klonalen Zellpopulation zu beschreiben, wobei für keinen kaninen Tumor bisher geklärt ist, welche der Theorien die Realität reflektiert. Es wird zum Einen davon ausgegangen, dass es sich bei der Tumorentstehung um eine stufenweise Akkumulation von Mutationen in zellteilungs- und differenzierungsrelevanten Genen im Rahmen einer malignen Progression handelt. Diese soll ausgehend vom Normalgewe-

be über gutartige Tumoren zum Endstadium eines malignen Tumors führen (Sorenmo 2009). Alternativ erscheint es auch möglich, dass alle Mutationen mit Relevanz für die Malignität bereits in sehr frühen Stadien der Karzinogenese vorhanden sind (van 't Veer 2002; Weigelt 2005). Möglicherweise schließen sich jedoch beide Theorien nicht zwingend aus sondern könnten ergänzende Erklärungsansätze für verschiedene Tumorarten darstellen. Die erste Theorie der malignen Progression ist attraktiv für die Erklärung der Entstehung von Tumorarten mit histologisch darstellbaren gutartigen Zwischenformen, während die zweite Theorie der initialen Malignität die Entstehung von Tumorarten ohne benigne Zwischenformen, wie z.B. Prostatakarzinome oder Osteosarkome des Hundes, erklären könnte.

Welche Mutationen bei der Entstehung von Tumoren bei Tieren eine Rolle spielen, ist für nahezu alle Tumorarten unbekannt. Lediglich für eine relativ kleine Population von circa 15 % der kaninen Mastzelltumoren konnte eine Mutation des Gens, welches für den Stammzellfaktor-Rezeptor (KIT) kodiert, als ätiologisch bedeutsam, wenn auch nicht allein verantwortlich, identifiziert werden (van 't Veer 2002; Zemke 2002; Welle 2008). Für die Entwicklung aussagekräftigerer Diagnostika und neuer Therapieansätze ist jedoch exakt dieses genauere Verständnis der molekularen Karzinogenese, der beteiligten Mutationen und der veränderten Signalwege eine Grundvoraussetzung.

Die genaue Diagnose und Prognose des klinischen Verhaltens bestimmter kaniner Tumoren im Bereich der Pathologie basieren heute, wie bereits in den letzten Jahrzehnten, immer noch nahezu ausschließlich auf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung-basierten Histopathologie. Dabei wird anhand empirischer Erfahrungswerte die Morphologie des Tumors mit dem zukünftigen klinischen Verhalten des Tumors korreliert. Aufgrund der akkumulierten Erfahrung ermöglicht dieser Ansatz für die meisten Tumorarten eine relativ gute Prognose des klinischen Verhaltens mittels Tumorbiopsien. Bei einzelnen Tumorarten, wie z. B. kaninen Milchdrüsentumoren, erscheint die Aussagekraft der histopathologischen Diagnose jedoch verbesserungswürdig. Während, abhängig vom Pathologen, circa 50 % der primären Tumoren histologisch als Karzinome eingestuft werden, zeigen nur circa 15 % der Tumoren letztlich metastatisches Verhalten (Moulton 1986; Benjamin 1999). Ergänzende molekulare Marker, wie z.B. PCR-Tests oder immunhistologische Marker, haben sich aufgrund von verschiedenen Faktoren noch nicht durchgesetzt. Eine der wichtigsten Ursachen ist die im Vergleich zur Histopathologie geringere Spezifität und Sensitivität bei höherem Arbeitsaufwand und Kosten.

Weiterhin wird von optimalen diagnostischen Markern gefordert, dass sie dem klinischen Onkologen Hinweise auf die Therapiestrategie geben. Dies erfordert jedoch eine

primäre Identifikation von therapeutischen Zielen und die Entwicklung von entsprechenden Wirkstoffen zu ihrer Beeinflussung. Auch hier erscheint das immer noch relativ begrenzte Wissen über die grundlegenden Mechanismen der molekulare Karzinogenese kaniner Tumoren den Fortschritt der angewandten onkologischen Forschung zu hemmen. Ein positives Beispiel für das Potenzial neuer Erkenntnisse über die Tumorentstehung stellt dabei die Einführung von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) zur Behandlung von Hunden mit Mastzelltumoren dar. Basierend auf den Erkenntnissen über die allgemeine Relevanz der Aktivität und im Speziellen der Mutation des Stammzellfaktor-Rezeptor KIT, eines Tyrosinkinase-Rezeptors, werden heute regelmäßig verschiedene Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Behandlung von kaninen Mastzelltumoren eingesetzt (Hahn 2008; Hahn 2010). Es ist zu erwarten, dass mit steigendem Erkenntnisstand über die Karzinogenese anderer Tumoren eine zielgerichtete Entwicklung neuer Therapieansätzen mit ähnlichem Erfolg auch für andere kanine Tumoren möglich sein wird.

Ziel dieser Arbeit war es daher für häufige und wichtige kanine Tumoren exemplarisch molekulare Karzinogenesefaktoren zu identifizieren und molekulare Tumor- und Malignitätsmarker zu entwickeln. So sollte erstens für kanine Milchdrüsentumoren und Mastzelltumoren die Malignitäts-assoziierte Genexpression auf RNA- und Proteinebene untersucht werden, um auf diese Weise neue Einblicke in ihre molekulare Genese zu erlangen. Zweitens sollten die Zielgene des kaninen Stammzellfaktors KIT und die Wirkweise seiner Hemmung durch TKI in kaninen Mastzellen näher charakterisiert werden. Drittens sollte durch Untersuchungen zur Genexpression kaniner Weichgewebssarkome die mögliche Ursprungszelle dieser Tumoren näher eingegrenzt werden und diagnostische Marker für die Abgrenzung peripherer Nervenscheidentumore von anderen Spindelzelltumoren entwickelt werden. Insgesamt sollte durch die im Folgenden beschriebenen Projekte mit zu diesem Zeitpunkt für die Veterinär-onkologie völlig neuartigen Methoden ein verbessertes Verständnis der molekularen Faktoren der Karzinogenese und die Entwicklung diagnostischer Marker für kanine Milchdrüsentumoren, Mastzelltumoren und kutane Weichgewebssarkome ermöglicht werden.

1.1 Gesamtliste der Publikationen dieser kumulativen Habilitationsschrift (*Publikationen 1-35*)

Die vorliegende Habilitationsschrift stellt eine kumulative Arbeit dar, die insgesamt 35 Publikationen in englischsprachigen Fachzeitschriften mit *peer review* aus den Jahren 2009-2012 vereint. Dabei handelt es sich um 30 Arbeiten mit eigener Erst- oder Letztautorenschaft und 5 Arbeiten mit Koautorenschaft. Bei vier der Arbeiten handelt es sich

um Übersichtsartikel bzw. Metaanalysen mit *peer review*, ein Artikel stellt ein eingela-
denes *Editorial* dar, während die restlichen 29 Artikel wissenschaftliche Originalartikel
repräsentieren.

Folgende Publikationen bzw. Daten aus folgenden Publikationen gingen in bereits ab-
geschlossene bzw. momentan im Abschluss befindliche Dissertationen am Fachbereich
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin ein, nicht jedoch in andere Habilitations-
schriften (P = eigene Publikationen):

Mareice Schütze (Dissertation 2010): P5, P7, P8, P14

Christian Sperling (Dissertation 2012): P5

Afonso da Costa (Dissertation 2012 eingereicht): P19, P20, P21

Patricia Schlieben (Dissertation 2012 eingereicht): P18, P22, P26, P29

Nadine Delcour (Dissertation 2013 in Vorbereitung): P25

Anja Meyer (Dissertation 2013 eingereicht): P27, P28, P29

Weiterhin sind die Publikation P11 Teil der abgeschlossenen Dissertation von Henning
Hvid an der Universität Kopenhagen (2010) und sind Ausschnitte aus P12 Teil der Dis-
sertation von Hoda Mabrouk an der Universität Potsdam (erwarteter Abschluss 2013).

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit zusammengefassten Publikationen in der chro-
nologischen Reihenfolge ihrer Erstnennung in den einzelnen Kapiteln aufgelistet. Wei-
terhin werden die Einzelbeiträge der einzelnen Autoren angegeben:

*P1. Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD (2011). Molecular
carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. Vet Pathol 48:98-
116, doi: 10.1177/0300985810390826*

a) Idee: Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD

b) Versuchsplanung: Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD

c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS,
Gärtner F, Gruber AD

d) Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner
F, Gruber AD

*P2. Klopfleisch R, Gruber AD (2012). Transcriptome and proteome research in veterinary
science: what is possible and what questions can be asked? TSWJ 2012:254962, doi:
10.1100/2012/254962*

a) Idee: Klopfleisch R

b) Versuchsplanung: Klopfleisch R

c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopfleisch R

d) Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, Gruber AD

- P3. **Klopffleisch R, Klose P, Gruber AD (2010).** *The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. Vet Pathol 47:446-454, doi: 10.1177/0300985810363904*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R, Klose P
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P4. **Klopffleisch R, Gruber AD (2009).** *Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. Vet Pathol 46:416-422, doi: 10.1354/vp.08-VP-0212-K-FL*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P5. **Klopffleisch R, Schütze M, Gruber AD (2010).** *RAD51 protein expression is increased in canine mammary carcinomas. Vet Pathol 47:98-101, doi: 10.1177/0300985809353310*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Schütze M, Klopffleisch R
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P6. **Klopffleisch R, Gruber AD (2009).** *Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. Res Vet Sci 87:91-96, doi: 10.1016/j.rvsc.2008.12.010*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P7. **Klopffleisch R, Schütze M, Gruber AD (2010).** *Downregulation of transforming growth factor beta (TGFbeta) and latent TGFbeta binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours. Vet J 186:379-384, doi: 10.1016/j.tvjl.2009.09.014*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R, Schütze M
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD

- P8. **Klopffleisch R, Schütze M, Gruber AD (2010).** *Loss of p27 expression in canine mammary tumors and their metastases. Res Vet Sci 88:300-303, doi: 10.1016/j.rvsc.2009.08.007*
- Idee: Klopffleisch R
 - Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Schütze M, Klopffleisch R
 - Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P9. **Klopffleisch R, Hvid H, Klose P, da Costa A, Gruber AD (2010).** *Insulin receptor is expressed in normal canine mammary gland and benign adenomas but decreased in metastatic canine mammary carcinomas similar to human breast cancer. Vet Comp Oncol 8:293-301, doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00232.x*
- Idee: Klopffleisch R
 - Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R, Hvid H, Klose P, da Costa A
 - Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P10. **Hvid H, Ekstrom CT, Vienberg S, Oleksiewicz MB, Klopffleisch R (2011).** *Identification of stable and oestrus cycle-independent housekeeping genes in the rat mammary gland and other tissues. Vet J 190:103-108, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.09.002*
- Idee: Klopffleisch R
 - Versuchsplanung: Klopffleisch R, Hvid, H, Vienberg S, Oleksiewicz MB
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Hvid H, Klopffleisch R
 - Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Hvid, H, Vienberg S, Oleksiewicz MB
- P11. **Hvid H, Klopffleisch R, Vienberg S, Hansen BF, Thorup I, Jensen HE, Oleksiewicz MB (2011).** *Unique expression pattern of the three insulin receptor family members in the rat mammary gland: dominance of IGF-1R and IRR over the IR, and cyclical IGF-1R expression. JAT 31:312-328, doi: 10.1002/jat.1627*
- Idee: Hvid H, Vienberg S, Hansen BF, Jensen H, Oleksiewicz MB
 - Versuchsplanung: Hvid, H, Klopffleisch R, Vienberg S, Oleksiewicz MB
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Hvid H, Klopffleisch R
 - Erstellung des Manuskripts: Hvid H, Klopffleisch R, Hansen BF, Oleksiewicz MB
- P12. **Mabrok HB, Klopffleisch R, Clavel T, Blaut M, Loh G (2012).** *Lignan transformation by gut bacteria lowers tumor burden in a gnotobiotic rat model of breast cancer. Carcinogenesis 33:203-208, doi: 10.1093/carcin/bgr256*
- Idee: Loh G
 - Versuchsplanung: Loh G
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Mabrok HB, Loh G, Klopffleisch R, Blaut M
 - Erstellung des Manuskripts: Loh G, Mabrok HB, Klopffleisch R, Clavel T, Blaut M,

- P13. **Klopffleisch R, Gruber AD (2009).** *Derlin-1 and stanniocalcin-1 are differentially regulated in metastasizing canine mammary adenocarcinomas. J Comp Pathol 141:113-120, doi: 10.1016/j.jcpa.2008.09.010*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P14. **Klopffleisch R, Schütze M, Linzmann H, Brunenberg L, Gruber AD (2010).** *Increased Derlin-1 expression in metastases of canine mammary adenocarcinomas. J Comp Pathol 142:79-83, doi: 10.1016/j.jcpa.2009.06.006*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Linzmann H, Brunenberg L, Gruber AD
- P15. **Klopffleisch R, Klose P, da Costa A, Brunenberg L, Gruber AD (2010).** *HEPACAM1 and 2 are differentially regulated in canine mammary adenomas and carcinomas and its lymph node metastases. BMC Vet Res 6:15, doi: 10.1186/1746-6148-6-15*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R, Klose P, da Costa A
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Brunenberg L, Gruber AD
- P16. **Klopffleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD (2010).** *Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. BMC Cancer 10:618, doi: 10.1186/1471-2407-10-618*
- a) Idee: Klopffleisch R, Gruber AD
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R, Lenze D
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P17. **Klopffleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD (2011).** *The metastatic cascade is reflected in the transcriptome of metastatic canine mammary carcinomas. Vet J 190:236-243, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.10.018*
- a) Idee: Klopffleisch R
 - b) Versuchsplanung: Klopffleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD
 - c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R, Lenze D
 - d) Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD

- P18. **Klopfleisch R**, Klose P, Weise C, Bondzio A, Multhaup G, Einspanier R, Gruber AD (2010). *Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: similarities to and differences from human breast cancer*. *J Prot Res* 9:6380-6391, doi: 10.1021/pr100671c
- Idee: Klopfleisch R
 - Versuchsplanung: Klopfleisch R, Gruber AD
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Klose P, Klopfleisch R
 - Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, Klose, P, Gruber AD
- P19. da Costa A, Oliveira JT, Gartner F, Kohn B, Gruber AD, **Klopfleisch R** (2011). *Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood*. *Vet J* 190:165-168, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.09.027
- Idee: Klopfleisch R
 - Versuchsplanung: Klopfleisch R
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: da Costa A, Klopfleisch R, Kohn B
 - Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, da Costa A, Gruber AD, Kohn B
- P20. da Costa A, Lenze D, Hummel M, Kohn B, Gruber AD, **Klopfleisch R** (2012). *Identification of six potential markers for the detection of circulating canine mammary tumour cells in the peripheral blood identified by microarray analysis*. *J Comp Pathol* 146:143-151, doi: 10.1016/j.jcpa.2011.06.004
- Idee: Klopfleisch R
 - Versuchsplanung: Klopfleisch R, Hummel M
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: da Costa A, Klopfleisch R, Lenze D, Kohn B
 - Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, da Costa A, Gruber AD, Kohn B
- P21. da Costa A, Kohn B, Gruber AD, **Klopfleisch R** (2012). *Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours*. *Vet J* 196:34-39, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.08.021
- Idee: Klopfleisch R
 - Versuchsplanung: Klopfleisch R
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: da Costa A, Klopfleisch R, Kohn B
 - Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, da Costa A, Gruber AD, Kohn B
- P22. Klose P, Weise C, Bondzio A, Multhaup G, Einspanier R, Gruber AD, **Klopfleisch R** (2011). *Is there a malignant progression associated with a linear change in protein expression levels from normal canine mammary gland to metastatic mammary tumors?* *J Prot Res* 10:4405-4415, doi: 10.1021/pr200112q
- Idee: Klopfleisch R
 - Versuchsplanung: Klopfleisch R, Gruber AD
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Klose P, Klopfleisch R, Weise C, Bondzio A
 - Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, Klose P, Gruber AD, Multhaup G, Einspanier R

- P23. Weiss AT, **Klopfleisch R**, Gruber AD (2010). Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *J Fel Med Surg* 12:929-935, doi: 10.1016/j.jfms.2010.07.006
- Idee: Weiss AT
 - Versuchsplanung: Weiss AT, Klopfleisch R
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Weiss, AT
 - Erstellung des Manuskripts: Weiss AT, Klopfleisch R, Gruber AD
- P24. Weiss AT, **Klopfleisch R**, Gruber AD (2011). T-cell receptor gamma chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *J Comp Pathol* 144:123-134, doi: 10.1016/j.jfms.2010.07.006
- Idee: Weiss AT
 - Versuchsplanung: Weiss AT, Klopfleisch R
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Weiss AT
 - Erstellung des Manuskripts: Weiss AT, Klopfleisch R, Gruber AD
- P25. Delcour NM, **Klopfleisch R**, Gruber AD, Weiss AT (2013). Canine cutaneous histiocytomas are clonal lesions as defined by X-linked clonality testing. *J Comp Pathol, Epub* 2013, doi: 10.1016/j.jcpa.2013.01.004.
- Idee: Weiss AT
 - Versuchsplanung: Weiss AT, Delcour, NM
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Weiss AT, Delcour, NM, Klopfleisch R
 - Erstellung des Manuskripts: Weiss AT, Delcour, NM, Klopfleisch R
- P26. Schlieben P, Meyer A, Weise C, Bondzio A, Einspanier R, Gruber AD, **Klopfleisch R** (2012). Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet J* 194:210-214, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.04.002
- Idee: Klopfleisch R
 - Versuchsplanung: Klopfleisch R, Klose P
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Klose P, Klopfleisch R, Meyer A, Weis C, Bondzio A, Einspanier R
 - Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, Klose P, Gruber AD
- P27. Meyer A, Gruber AD, **Klopfleisch R** (2012). CD25 Is expressed by canine cutaneous mast cell tumors but not by cutaneous connective tissue mast cells. *Vet Pathol* 49:988-997, doi: 10.1177/0300985812439215
- Idee: Klopfleisch R
 - Versuchsplanung: Klopfleisch R, Meyer A
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Meyer, A, Klopfleisch R,
 - Erstellung des Manuskripts: Meyer A, Klopfleisch R, Gruber AD

- P28. Meyer A, Gruber AD, **Klopffleisch R** (2012). All subunits of the interleukin receptor 2 are expressed on canine cutaneous mast cell tumors. *J Comp Pathol*, Epub Dec 2012, doi: 10.1016/j.jcpa.2012.11.232
- Idee: Klopffleisch R
 - Versuchsplanung: Klopffleisch R, Meyer A
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Meyer, A, Klopffleisch R,
 - Erstellung des Manuskripts: Meyer A, Klopffleisch R, Gruber AD
- P29. Schlieben P, Meyer A, Weise C, Bondzio A, Einspanier R, Gruber AD, **Klopffleisch R** (2012). Tandem duplication of KIT exon 11 influences the proteome of canine mast cell tumours. *J Comp Pathol Epub Aug 2012*, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.04.002
- Idee: Klopffleisch R
 - Versuchsplanung: Klopffleisch R, Klose P
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Klose P, Klopffleisch R, Meyer A, Weis C, Bondzio A, Einspanier R
 - Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Klose P, Gruber AD
- P30. **Klopffleisch R**, Meyer A, Schlieben P, Bondzio A, Weise C, Lenze D, Hummel M, Einspanier R, Gruber AD (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: 10.1016/j.tvjl.2012.04.002
- Idee: Klopffleisch R
 - Versuchsplanung: Klopffleisch R
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R, Klose P, Meyer A, Weis C, Bondzio A, Lenze D, Hummel M, Einspanier R
 - Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Gruber AD
- P31. **Klopffleisch R**, Meyer A, Lenze D, Hummel M, Gruber AD (2012). Canine cutaneous peripheral nerve sheath tumours versus fibrosarcomas can be differentiated by neuroectodermal marker genes in their transcriptome. *J Comp Pathol* 148: 197-205, doi: 10.1016/j.jcpa.2012.06.004
- Idee: Klopffleisch R
 - Versuchsplanung: Klopffleisch R, Gruber AD
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R, Meyer A, Lenze D, Hummel M
 - Erstellung des Manuskripts: Klopffleisch R, Meyer A, Gruber AD
- P32. **Klopffleisch R**, Weiss AT, Gruber AD (2011). Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol Histopathol* 26:797-810
- Idee: Klopffleisch R
 - Versuchsplanung: Klopffleisch R
 - Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopffleisch R

d) Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, Weiss AT, Gruber AD

P33. Weiss AT, Delcour NM, Meyer A, **Klopfleisch R** (2011). Efficient and cost-effective extraction of genomic DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Vet Pathol* 48:834-838, doi: 10.1177/0300985810380399

a) Idee: Weiss AT, Klopfleisch R

b) Versuchsplanung: Weiss AT, Klopfleisch R

c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Weiss AT, Delcour NM, Meyer A, Klopfleisch R

d) Erstellung des Manuskripts: Weiss AT, Delcour NM, Meyer A, Klopfleisch R

P34. **Klopfleisch R**, Sperling C, Kershaw O, Gruber AD (2011). Does the taking of biopsies affect the metastatic potential of tumours? A systematic review of reports on veterinary and human cases and animal models. *Vet J* 190:e31-42, doi: 10.1016/j.tvjl.2011.04.010

a) Idee: Gruber AD

b) Versuchsplanung: Sperling C, Gruber AD

c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Sperling C, Klopfleisch R, Kershaw O

d) Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R, Sperling C, Gruber AD

P35. **Klopfleisch R** (2012). Personalized medicine in veterinary oncology: Minimal residual disease and circulating tumour cells in dogs. *Vet J* 195:263-264, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.10.001

a) Idee: Klopfleisch R

b) Versuchsplanung: Klopfleisch R

c) Versuchsdurchführung / Auswertung: Klopfleisch R

d) Erstellung des Manuskripts: Klopfleisch R

2 Kanine Milchdrüsentumoren

2.1 Offene Fragen (Publikationen 1-2)

Die Diagnose und prognostische Beurteilung von kaninen Milchdrüsentumoren basiert in der anatomischen Pathologie momentan nahezu vollständig auf der Evaluation von histologischen Parametern. Zum einen wird anhand der allgemein akzeptierten Klassifikation der *World Health Organization* eine Einteilung der Tumoren anhand Ihrer histologischen Wuchsform vorgenommen (Misdorp 1999). Epidemiologisch werden nach dieser Einteilung vor allem einfache, das heißt rein epitheliale, Adenome und Karzinome und komplexe, das heißt gemischt epitheliale und myoepitheliale Adenome und Karzinome als häufigste Tumoren der Milchdrüse bei der Hündin identifiziert (Lana 2007). Diese Kriterien werden im Weiteren, sofern möglich, durch die Begutachtung des Invasionsverhaltens des Tumors am Tumorrand, die Tumorgroße und die Untersuchung des Lymphknotenstatus ergänzt (Sorenmo 2011). In ihrer Gesamtheit führen diese Kriterien, teils mit Unterschieden zwischen den begutachtenden Pathologen, zur Feststellung einer Bösartigkeit für 41-53 % der Primärtumoren (Webster 2007; Letard 2008). Retrospektive Studien zeigten jedoch, dass nur circa 15 % der Primärtumoren letztlich eine Metastasierung oder ein lokal invasives Wachstumsverhalten aufwiesen und somit zum Tode der Hündin führten (Moulton 1986; Benjamin 1999). Es wurde somit folgende im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Hypothese aufgestellt:

Hypothese 1: *Kanine Milchdrüsentumoren enthalten molekulare Marker, die eine genauere Vorhersage der zukünftigen Metastasierung sowie Rückschlüsse auf ihre molekulare Karzinogenese ermöglichen.*

Zahlreiche Studien zur Proteinexpression in kaninen Milchdrüsentumoren versuchten in den letzten Jahren bereits, vorrangig Immunhistologie-basierte, Marker für eine Vorhersage ihres klinischen Verhaltens zu etablieren (**P1**). Dabei zeigte sich, dass diese keinen über die histopathologische Charakterisierung der Tumoren hinausgehenden diagnostischen Mehrwert haben. Ähnliche Erkenntnisse in der humanmedizinischen Forschung haben dazu geführt, dass zunächst im Bereich der klinischen Forschung und in den letzten Jahren zunehmend auch in der diagnostischen Routine komplexe Expressionsmuster in humanen Brustkrebsgewebeproben zur Prognoseeinschätzung und Therapieentscheidung genutzt werden (van 't Veer 2002). Dabei wird momentan insbesondere die Mikroarray-Technologie für die Analyse der mRNA-Expression und in geringerem Umfang verschiedene Proteomics-Technologien zur Analyse komplexer Pro-

teinexpressionsmuster genutzt, während ähnliche Ansätze in der Tiermedizin noch nicht vorliegen (**P2**). Folgende Hypothese sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

Hypothese 2: *Komplexe mRNA- und Proteinexpressionsmuster ermöglichen eine genauere Vorhersage der zukünftigen Metastasierung kaniner Milchdrüsentumoren und erklären die Malignität der Tumoren.*

In Bezug auf die Metastasierung kaniner Milchdrüsentumoren wird davon ausgegangen, dass es zunächst zu einer Absiedlung von Tumorzellen in den regionären Lymphknoten kommt. Im nächsten Schritt der metastatischen Kaskade wird dann eine Absiedlung in entfernte Organe und hier insbesondere hämatogen in die Lunge über das periphere Blut angenommen (Lana 2007). Diese Annahmen basieren jedoch ausschließlich auf der Schlussfolgerung, dass eine Verbreitung von metastasierenden Tumorzellen von der Milchdrüse bzw. dem betroffenen regionären Lymphknoten zu entfernten Organen nur über das periphere Blut möglich ist. Ein direkter Nachweis von Milchdrüsentumorzellen im Blut von Hündinnen mit metastasierenden Tumoren erfolgte bisher nicht. Ursächlich hierfür ist vor allem das Fehlen von diagnostischen Mitteln zum Nachweis dieser Tumorzellen. Kenntnisse über die Molekularbiologie dieser zirkulierenden Tumorzellen, den Zeitpunkt ihres Auftretens und ihre Häufigkeit im peripheren Blut würden jedoch einen signifikanten Fortschritt des Verständnisses der metastatischen Kaskade kaniner Milchdrüsentumoren ermöglichen. Weiterhin zeigen erste erfolgreiche Untersuchungen im humanmedizinischen Bereich, dass der Nachweis zirkulierender Brustkrebszellen im peripheren Blut von Patientinnen eine frühere Diagnose eines metastasierenden Tumors ermöglicht, mit der Überlebenszeit der Patientinnen korreliert und zur Überwachung des therapeutischen Erfolgs beiträgt (Moulton 1986; Zemke 2002; Hayes 2006). Ausgehend von diesem wissenschaftlichen Kenntnisstand ergaben sich die folgenden zwei in dieser Arbeit zu prüfende Hypothesen:

Hypothese 3: *Im Blut von Hündinnen mit metastasierenden Milchdrüsentumoren sind zirkulierende Tumorzellen mittels mRNA-Marker nachweisbar.*

Hypothese 4: *Der Nachweis dieser Marker korreliert mit dem metastatischen Verhalten der Tumore.*

Alle zuvor gestellten Hypothesen ergeben sich insbesondere aufgrund des bisher noch stark eingeschränkten Kenntnisstandes über die molekularen Mechanismen der Karzinogenese kaniner Milchdrüsentumore. Die bisher einzige wissenschaftlich belastbare Erkenntnis zur Ätiologie kaniner Milchdrüsentumoren ist der Nachweis eines Einflusses

des Hormonhaushaltes auf die Inzidenz der Tumoren. So führt eine frühzeitige Kastration der Hunde vor der ersten Läufigkeit zu einer Reduktion der Tumorzinzidenz um 99,5% (Schneider 1969). Andere Studien konnten weiterhin zeigen, dass auch eine spätere Kastration die Häufigkeit von Milchdrüsentumoren reduziert (Benjamin 1999). Abgesehen davon wurden bereits viele potenzielle Mechanismen der Tumorentstehung analysiert, von denen jedoch nur wenige, wie zum Beispiel eine aberrante Expression des *Phosphatase and Tensin Homologs* (PTEN) (Ressel 2009), einen direkten Einfluss auf die Malignität der Tumoren zu haben scheinen, während relevante Tumor-assoziierte Mutationen völlig unbekannt sind (**P1**). In diesem Zusammenhang ist momentan die chronologische Abfolge der molekularen Entstehung kaniner Milchdrüsentumoren ebenfalls völlig unbekannt. In der bis zum Beginn dieser Arbeit einzigen Studie zu diesem Thema wurde aufgrund des größeren Durchmessers maligner Tumoren und des höheren Alters der von diesen betroffenen Hündinnen eine kontinuierliche maligne Progression der Tumoren vom physiologischen Milchdrüsengewebe über benigne Tumorzwischenstufen hin zum malignen, metastasierenden Tumor postuliert (Sorenmo 2009). Andererseits zeigen Untersuchungen an humanem Brustkrebsgewebe, dass das metastasierende Potenzial der Tumoren bereits in sehr frühen Phasen Ihrer Entwicklung festgelegt ist und dass Adenome und Adenokarzinome der Milchdrüse möglicherweise völlig unabhängige, selbstständige Entitäten darstellen (van 't Veer 2002). Ausgehend von dieser ungeklärten Dichotomie der Erklärungsmöglichkeiten zur Entstehung von kaninen Milchdrüsentumoren wurde folgende Hypothese in der vorliegenden Arbeit geprüft:

Hypothese 5: *Der Vergleich der Proteome von normaler Milchdrüse, Milchdrüsenadenomen und metastasierenden Milchdrüsenkarzinomen zeigt kontinuierliche, lineare Proteinexpressionsveränderungen, in deren Rahmen es zu einer malignen Progression kommt.*

Insgesamt wurden somit fünf Hypothesen zur Molekularbiologie kaniner Milchdrüsentumore aufgestellt, die in mehreren wissenschaftlichen Projekten mit verschiedenen methodischen Ansätzen untersucht wurden.

2.2 Metastasierungs-assoziierte Genexpression

Hypothese 1: Kanine Milchdrüsentumoren enthalten molekulare Marker, die eine genauere Vorhersage der zukünftigen Metastasierung sowie Rückschlüsse auf ihre molekulare Karzinogenese ermöglichen (P3-15).

In der ersten Phase des Projektes zur Analyse der molekularen Mechanismen der Karzinogenese und Identifikation diagnostischer Marker für kanine Milchdrüsentumoren wurde die mRNA- und Proteinexpression verschiedener Gene in normaler Milchdrüse, einfachen Adenomen, einfachen metastasierenden Karzinomen und ihren Lymphknotenmetastasen verglichen. Dazu wurde in einem ersten Schritt hochreines Tumorgewebe der genannten Gewebegruppen mittels Laser-Mikrodissektion aus Kryostatschnitten gewonnen. Diese aufwendige Methode wurde genutzt, um Verzerrungen in der Genexpression durch Tumor-umgebendes Bindegewebes bzw. -umgebende Lymphozyten zu vermeiden. Die gewonnenen Gewebeproben wurden dann mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von insgesamt 49 Genen hin untersucht (P3). Insgesamt 17 dieser Gene zeigten signifikante ($p < 0.05$) Unterschiede in der Genexpression zwischen benignen und malignen Tumoren.

Eine Gruppe der untersuchten Gene umfasste Gene mit Einfluss auf die DNA-Reparaturmechanismen, die eine zentrale Rolle bei der Karzinogenese des humanen Brustkrebses spielen. So zeigten die *Breast Cancer Associated Gene 1* und *2* (BRCA1, 2) und das Gen des *Radiation Induced Protein 51* (RAD51) signifikante mRNA-Expressionsunterschiede zwischen benignen und malignen Milchdrüsentumoren (P4). Eine immunhistologische Untersuchung der RAD51-Proteinexpression in den Tumorgruppen konnte die erhöhte RAD51-Expression in malignen Tumoren bestätigen, während keine für den Hund geeigneten Antikörper für BRCA1 und BRCA2 identifiziert werden konnten (P5). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen beim humanen Brustkrebs, bei dem eine Überexpression von BRCA2 und RAD51 mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Bieche 1999; Sorenmo 2011). Handelt es sich bei diesen überexprimierten kaninen Genen um nicht-mutierte Wildtyp-Varianten, so scheinen primäre, maligne Milchdrüsenkarzinome eine starke Reaktion auf eine zu vermutende DNA-Stabilität zu zeigen. Alternativ könnte es sich bei den überexprimierten RAD51- und BRCA-Genen jedoch auch um nicht-funktionale, mutierte Formen handeln, die im Rahmen einer Hyperaktivierung die fehlende Funktionalität ausgleichen sollen.

Eine weitere untersuchte Gengruppe umfasste Gene mit direktem Einfluss auf die Zellzyklusprogression. Hierbei wurde die Malignitäts-abhängige Expression der Cyclin-

abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27 untersucht, welche einen direkten Zellzyklusstopp hervorrufen können (Colozza 2005; Goldschmidt 2011). Während p27 in neoplastischen Milchdrüsenzellen durch eine Aktivierung des *Transforming Growth Factor Beta* (TGFB) hervorgerufen wird, induzieren DNA-Schäden über eine Aktivierung von p53 die Expression von p27 (el-Deiry 1994; Rivera 2011). Die Untersuchung der mRNA-Expression identifizierte signifikante, Malignitäts-assoziierte Expressionsmuster von p21, p27, TGFB3, TGFB-Rezeptors 3 und die *Latent TGF-binding Proteine* (LTBP) 1, 4, während p53 und alle weiteren TGFB-Rezeptoren und TGFB-Varianten eine ähnliche Expression im Normalgewebe, Adenomen und Metastasen zeigten (**P6, P7**). Die verminderte Expression der TGFB3-p27-Achse in malignen kaninen Milchdrüsenengewebe konnte im Folgenden auch auf Proteinebene bestätigt werden (**P7, P8**). Zusammengefasst konnte somit ein p27-vermittelter Verlust der inhibierenden Wirkung des TGFB3 auf den Zellzyklus als mögliche Ursache erhöhter Proliferationsraten maligner Tumorzellen gezeigt werden, während die erhöhte Expression von p21 in malignen Zellen offensichtlich keine proliferationsvermindernde Wirkung zeigt.

Unabhängig von der eingeschränkten Zellzykluskontrolle aufgrund fehlexprimierter Tumorsuppressorgene müssen jedoch in malignen Tumorzellen auch Mechanismen der Aktivierung der Zellproliferation vorhanden sein. So konnte bereits durch andere Arbeitsgruppen ein Einfluss der *Insulin-Like Growth Factors* (IGF) und ihrer Rezeptoren (IGFR) auf die Proliferation von murinen und kaninen Milchdrüsentumoren gezeigt werden (Gilbertson 1983; Mol 1997). Weiterhin wurde kürzlich die Hypothese publiziert, dass bestimmte Insulinanaloga über eine erhöhte Aktivierung von IGFR oder des Insulinrezeptors das Risiko für die Entstehung von Brustkrebs erhöhen (Smith 2009). Auf der Basis dieses Kenntnisstandes wurde die Expression der IGF-, IGFR-Gene, des Insulin- und des Insulinrezeptorgens bei den kaninen Milchdrüsentumoren unterschiedlicher Malignität untersucht (**P9**). Dabei zeigte sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine verminderte Expression des Insulinrezeptors und der IGF in Karzinomen und Metastasen, was eine Relevanz der Stimulierung des Insulinrezeptors zumindest in späteren Phasen der Karzinogenese kaniner Milchdrüsentumoren als fraglich erscheinen lässt. Im Rahmen der Untersuchungen des Einflusses der Insulinrezeptorexpression wurden die Studien in Zusammenarbeit mit der Universität Kopenhagen auf ein Rattenmodell des humanen Brustkrebses ausgeweitet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die drei Mitglieder der Insulinrezeptorfamilie unterschiedlich stark in nicht-neoplastischer Rattenmilchdrüse exprimiert werden, und dass ihre Expression teilweise vom Östruszyklus abhängt (**P10, P11**). Weiterhin wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam der Einfluss von Phyt-

östrogenen und die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora auf die Proliferation von Milchdrüsentumoren im Rattenmodell untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit der Phytöstrogen-abhängigen Proliferation der Tumoren von der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora (**P12**).

Erhöhte Proliferationsaktivität und Volumenwachstum maligner Tumoren sind mit einem erhöhten Stress für die Tumorzellen verbunden. Tumorzellen sind jedoch durch eine erhöhte Stressresistenz gegenüber Hypoxie, Ischämie und die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen infolge übermäßiger Stoffwechselbeanspruchung gekennzeichnet (Wang 2008). So wurde zum Beispiel Derlin 1 als ein mögliches Gen identifiziert, das im Rahmen der *Unfolded Protein Response* eine erhöhte Stressresistenz von Tumorzellen ermöglicht (Wang 2008). Eine Untersuchung der Expression dieser Gene in kaninem Normalgewebe, Adenomen, Karzinomen und metastasierenden Tumorzellen konnte eine signifikante Erhöhung der Derlin 1-Expression mit zunehmender Malignität identifizieren (**P13, P14**). Auffällig war dabei die ausgesprochen starke Derlin 1-Expression in intravaskulären Tumorzellen, was zum einen auf das stressreiche Milieu in Lymph- oder Blutgefäßen hinweist, andererseits aber auch die scheinbar gute Reaktions- und somit Überlebensfähigkeit dieser Zellen im Blutstrom erklären könnte.

Das Eindringen in den Blutstrom erfordert von Tumorzellen zum einen die verminderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und andererseits die erhöhte Expression von Proteasen bzw. die verminderte Expression von Proteaseinhibitoren für die Invasion der umgebenden Extrazellulärmatrix (Pantel 2004). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der *Hepatocyte Cell Adhesion Molecules* (HEPACAM) 1 und 2 und des Proteinaseinhibitors Maspin untersucht. Dabei zeigte sich lediglich eine verminderte Expression von HEPACAM 1 in Adenomen, während metastasierende Karzinome ähnliche Expressionsmuster wie Normalgewebe zeigten (**P15**). Die Maspin-Expression war hingegen hochgradig variabel in den einzelnen Gewebeproben und korrelierte nicht mit der Malignität der Tumoren (**P3**). Während HEPACAM1 zumindest in frühen Stadien der Tumorentwicklung eine Relevanz für die Karzinogenese haben könnte, scheint Maspin keine generelle Rolle bei der Entstehung von Milchdrüsentumoren zu haben.

MicroRNA (miRNA) sind eine heterogene Gruppe nicht-kodierender, regulatorischer RNA-Moleküle. Ihre Bedeutung ergibt sich aus ihrer Fähigkeit, verschiedene Aspekte des Zellmetabolismus über eine Verhinderung der Translation von mRNA in Proteine zu unterdrücken (Ambros 2004). Über die physiologische Funktion kaniner miRNA bzw. ihren Einfluss auf die Karzinogenese kaniner Tumoren ist bisher jedoch nahezu nichts

bekannt. Dies ist zum Einen auf die relative Neuartigkeit des allgemeinen Wissens über miRNA zurückzuführen, zum Anderen waren zumindest zu Beginn des hier beschriebenen Projektes keine Hunde-spezifischen PCR-Nachweismethoden für miRNA erhältlich. Zur Untersuchung des Einflusses der Expressionsstärke von miRNA auf die Karzinogenese kaniner Tumoren wurden deshalb in einem Teilprojekt Hunde-spezifische PCR-Assays zum Nachweis von 21 miRNA und 5 *Small Nucleolar RNA* (snoRNA) als *Housekeeping* Gene etabliert (von Deetzen 2013, im Druck). Die dabei entwickelten Assays wurden basierend auf einer Zeit und Aufwand sparenden universalen reversen cDNA-Transkription mit *polyA-Tailing* entwickelt und ermöglichen eine robuste und sensitive Quantifizierung kaniner miRNA. Die snoRNA zeigten sich als zumeist stabil exprimiert in nicht-neoplastischen und neoplastischen Geweben und sind somit aufgrund ihrer ähnlichen Molekulargröße als *Housekeeping*-Gene für die miRNA-Quantifizierung gut geeignet. Erste Untersuchungen zur Malignitäts-assoziierten miRNA-Expression in kaninen Milchdrüsenadenokarzinomen mit und ohne Lymphknotenmetastasen, Milchdrüsenadenomen und normalem Milchdrüsengewebe konnte für vier der untersuchten miRNA eine signifikant unterschiedliche Expression in den verschiedenen Tumorgruppen identifizieren (von Deetzen, in Vorbereitung). Obwohl die funktionelle Relevanz dieser Expressionsunterschiede zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar ist, führen diese vorläufigen Ergebnisse zu der Hypothese, dass das Expressionsniveau von miRNA direkt oder indirekt die Karzinogenese kaniner Milchdrüsentumoren beeinflusst.

Generell konnten durch die Untersuchung der Genexpression von 49 Genen in Laser-mikrodissezierten Geweben mehrere Gene identifiziert werden, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung kaniner Milchdrüsentumoren zu spielen scheinen. Diese Erkenntnisse ermöglichen es nun, die Gene und die assoziierten Signalkaskaden und zellulären Mechanismen Hypothesen-getrieben weiter zu untersuchen, um möglicherweise neue therapeutische Ansätze für diese Tumorart entwickeln zu können. In Bezug auf die diagnostische Verwertbarkeit zeigten 17 der 49 Gene eine signifikant unterschiedliche Expression in Tumorgeweben unterschiedlicher Dignität (**P3**). Diese signifikanten Unterschiede stellten sich jedoch als Unterschiede im Mittel der Expression in den Gewebeprobengruppen dar. Eine vollständig spezifische und sensitive diagnostische Zuordnung eines Tumors zu seiner Gruppe war hingegen nur durch Kombination der Genexpression von mindestens drei Genen möglich: *Bone morphogenetic protein 2* (BMP2), LTBP4 und Derlin 1 (**P3**). Insgesamt konnte somit aus den Erkenntnissen der ersten Projektphase geschlossen werden, dass komplexe mRNA- oder Proteinexpres-

sionsmuster eine verbesserte diagnostische Differenzierung kaniner Milchdrüsentumoren ermöglichen könnten.

2.3 Komplexe Malignitäts-assoziierte mRNA- und Proteinexpressionsmuster

***Hypothese 2:** Komplexe mRNA- und Proteinexpressionsmuster ermöglichen eine genauere Vorhersage der zukünftigen Metastasierung kaniner Milchdrüsentumoren und erklären die Malignität der Tumoren (P16-18).*

Ausgehend von den Befunden der ersten Projektphase, die zeigten, dass komplexe mRNA Expressionsmuster gezielt selektierter Gene eine verbesserte Einordnung der Tumoren in benigne und maligne Tumoren ermöglichte, sollte in der zweiten Phase mittels explorativer Transkriptom- und Proteomanalysen die Suche nach verbesserten komplexen Tumormarkern erweitert werden. Weiterhin wurde erhofft, dass die globalen Genexpressionsanalysen das Verständnis der Malignität kaniner Tumoren verbessert. Der Nutzen von Transkriptom- und Proteomanalysen für Diagnostik und Therapie wurde vor dieser Arbeit bereits exemplarisch für den humanen Brustkrebs beschreiben (Übersicht in **P2**). So konnte im Rahmen einer Pionierarbeit gezeigt werden, dass eine Expressionssignatur von 70 Genen eine verbesserte Prognose des Auftretens von Metastasen innerhalb von fünf Jahren nach initialer Behandlung ermöglicht (van 't Veer 2002). Je nach Geneexpression besteht durch diesen Test die Möglichkeit, die Aggressivität der Therapieform abzuwägen und Nebenwirkungen und Leiden zu mindern.

Ausgehend von diesen ermutigenden Erfolgen in der Humanmedizin wurde im Rahmen dieser Arbeit eine erste Transkriptomanalyse der Unterschiede zwischen metastasierenden und nicht-metastasierenden Milchdrüsentumoren vorgenommen. Die Auswahl dieser beiden Gruppen basierte auf dem einleitend bereits erwähnten Problem der diagnostischen Tierpathologie, metastatisches Verhalten kaniner Milchdrüsentumoren exakt vorherzusagen. Während Adenome mit der Standardhistopathologie mit großer Sicherheit von Karzinomen abgrenzbar sind, besteht weiterhin das Problem metastasierende Karzinome aus der Gesamtgruppe der Karzinome zu isolieren. Die vergleichende Transkriptomanalyse der beiden Tumorguppen identifizierte mehr als 1000 Gene mit signifikant unterschiedlicher Expression in metastasierenden Tumoren (**P16**). Dabei zeigten sich vor allem Gene der Zellzyklusregulation, der Matrixmodulation, der Proteinfaltung und der proteosomalen Degradation verändert exprimiert. 256 der kaninen Gene konnten mittels Literaturdatenbankanalyse als ebenfalls relevant für die Kar-

zinogenese des humanen Brustkrebses identifiziert werden. Weiterhin fand sich eine 68 %ige Übereinstimmung mit der prognostischen 70-Gensignatur im humanen Brustkrebs (**P16**) (van 't Veer 2002).

Unabhängig von den Unterschieden in der Genexpression zwischen metastasierenden und nicht-metastasierenden Karzinomen wurde in einem zweiten Ansatz der Unterschied in der Genexpression zwischen metastasierenden Karzinomen und normalem Milchdrüsengewebe desselben Tieres untersucht (**P17**). Dieser Ansatz sollte erste Einblicke in die grundsätzlichen Mechanismen der Malignität kaniner Milchdrüsentumoren ermöglichen und die Grundlage für weiterführende Hypothesen sein. Funktionell konnte die Mehrheit der 1312 differentiell exprimierten Gene in metastasierenden Karzinomen den wichtigsten Schritten der metastatischen Kaskade zugeordnet werden (Brodey 1983). So kann davon ausgegangen werden, dass Proliferation, Entdifferenzierung und Verlust von epithelialen Zell-Zell-Kontakten wichtige Prozesse im Primärtumor darstellen, die für eine anschließende hämatogene Metastasierung essentiell sind. In den metastasierenden Tumoren fand sich entsprechend eine signifikante Überexpression von Invasionsgenen wie Matrix-Metalloproteinasen oder Zellzyklus-Inhibitoren, während Gene der epithelialen Differenzierung und Wachstumsfaktorrezeptorgene signifikant unterexprimiert werden. Insbesondere letzterer Punkt könnte die steigende Unabhängigkeit der Tumorzellen von externen Wachstumsreizen mit zunehmender Malignität reflektieren. Wiederum fanden sich auch bei dieser Untersuchung klare Hinweise für viele überlappende Gensignaturen mit dem humanen Brustkrebs, was auf eine mögliche Nutzung der kaninen Milchdrüsentumoren als spontanes Tumormodell für die humane Erkrankung hinweist.

Parallel zu den Untersuchungen des Transkriptomts metastasierender Karzinome mittels Mikroarray-Analyse wurden die gleichen Tumorgewebe auf ihre globalen Proteinexpressionsunterschiede hin untersucht (**P18**). Dabei wurde die Methode der 2-dimensionalen Gelelektrophorese bzw. der 2-dimensionalen differentiellen Gelelektrophorese (2D-DIGE) angewendet, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Tiermedizin eingesetzt wurde. Die mittels dieser Fluoreszenz-basierten Proteomanalysemethoden nachgewiesenen Proteine wurden dann in der Massenspektrometrie identifiziert. Insgesamt konnten 21 Proteine mit signifikant unterschiedlicher Expression in metastasierenden Karzinomen im Vergleich mit nicht-metastasierenden Karzinomen identifiziert werden. So konnte eine Überexpression von Proteinen mit proliferativer Aktivität, wie das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) oder der *Eukaryotic Elongation Factor 1 Delta* (EEF1D) gezeigt werden. Andererseits fanden sich Proteine mit Einfluss auf die Zellmotilität, wie Vinculin oder Coronin 1, die Matrix-Metalloproteinasen-Inhibitoren

Bomapin und Maspin und Proteine mit Funktionen zum Schutz vor oxidativem Stress überexprimiert. Neunzehn der Proteine zeigten weiterhin eine mit der Situation beim humanen Brustkrebs identischen Expressionsregulation. Insgesamt auffällig war die im Vergleich mit den Ergebnissen der Transkriptomanalyse relativ geringe Zahl an regulierten Proteinen. Diese Unterschiede könnten zum Einen mit der geringeren Sensitivität der Proteomanalyse oder zum Anderen mit einer post-transkriptionalen Regulation der Genexpression zum Beispiel durch miRNA erklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Ergebnisse der globalen Genexpressionsanalysen feststellen, dass metastatische und nicht-metastatische kanine Karzinome tatsächlich mittels komplexer mRNA- und Proteinexpressionsprofilen abgegrenzt werden können. Die Mehrzahl der Gene zeigt weiterhin überlappende Expressionsmuster in humanen und kaninen Milchdrüsentumoren und sind mit zellulären Funktionen assoziiert, die auf eine Rolle bei der Induktion und Erhaltung des malignen Potenziales und der Metastasierung der Tumoren schließen lassen. Die identifizierten Gene könnten somit als Grundlage für neue diagnostische Nachweismethoden dienen, erweitern aber gleichzeitig den Erkenntnishorizont über die molekulare Karzinogenese kaniner Milchdrüsentumore.

2.4 Zirkulierende Tumorzellen als Metastasierungsmarker

Hypothese 3: *Im Blut von Hündinnen mit metastasierenden Milchdrüsentumoren sind zirkulierende Tumorzellen mittels mRNA-Marker nachweisbar (P19-20).*

Hypothese 4: *Der Nachweis dieser Marker korreliert mit dem metastatischen Verhalten der Tumore (P21).*

Sowohl nicht-metastatische als auch metastatische Karzinome zeigen eine lokale, unkontrollierte Proliferation und erhöhte Stressresistenz. Metastatische Tumoren besitzen zusätzlich jedoch die Fähigkeiten zur Durchdringung der umgebenden Extrazellulärmatrix und der Gefäßwand und zum Überleben im Blutstrom als zirkulierende Tumorzellen (Brodey 1983). Das Vorhandensein dieser zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut ist eine essentielle Voraussetzung für die Entstehung von Fernmetastasen und ihr Nachweis wäre somit von hohem diagnostischem Wert für die Prognose der Entstehung von Fernmetastasen. Ein Nachweis zirkulierender Tumorzellen wurde jedoch bisher aufgrund des Fehlens entsprechender Nachweismethoden in der Tiermedizin nicht geführt.

Das erste Ziel des hier beschriebenen Projekts war deshalb die Entwicklung einer PCR-basierten Nachweismethode für zirkulierende Milchdrüsentumorzellen im Blut von Hunden. Aufgrund des kompletten Fehlens von Informationen über die Eigenschaften kaniner zirkulierender Milchdrüsentumoren basierte die Selektion von hypothetischen Markergenen für kanine zirkulierende Tumorzellen auf drei Ansätzen. Zum einen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Gene, deren Expression im peripheren Blut von humanen Patientinnen mit dem Auftreten zirkulierender Brustkrebszellen assoziiert ist, möglicherweise auch bei Hündinnen mit Milchdrüsentumoren eine Rolle spielen könnten. Insgesamt führte dieser Ansatz zur Selektion von 25 potenziellen Markergenen (**P19**). Weiterhin wurde hypothetisiert, dass Gene mit bekannt hoher Expression in metastasierenden kaninen Milchdrüsentumoren eine Identifikation von metastasierenden Tumorzellen im peripheren Blut ermöglichen könnten. Basierend auf dieser Hypothese wurden 44 Gene selektiert (**P20**). Im dritten Ansatz wurde explorativ die globale mRNA Expression metastasierender Karzinome mit der globalen mRNA-Expression im peripheren Blut gesunder Hündinnen verglichen. Mit diesem Ansatz konnten 33 Gene mit signifikant und mindestens 200-fach höherer Expression in Karzinomen im Vergleich zum peripheren Blut identifiziert werden (**P19, 20**). In einem zweistufigen Testverfahren wurden dann die 102 Kandidatengene auf ihre Spezifität und Sensitivität zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen untersucht. So wurde zunächst verlangt, dass ein potenzielles Markergen ein hohes Expressionsniveau in metastasierenden Karzinomen hat, andererseits jedoch nie im Blut gesunder Hündinnen exprimiert wird. Lediglich 12 der 102 Kandidatengene zeigten das geforderte Expressionsmuster und wurden in einem zweiten Schritt auf ihre Sensitivität zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen getestet. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen von in Zellkultur gehaltenen kaninen Milchdrüsenkarzinomzellen in peripherem Blut angefertigt. Aufgrund der Erkenntnisse der humanmedizinischen Forschung, dass zirkulierende Tumorzellen mit einer Tumorzelle pro 10^7 - 10^9 peripheren Blutleukozyten relativ seltene Ereignisse sind (Alunni-Fabbroni 2010), wurde der Nachweis von einer kaninen Tumorzelle in 10^7 Blutleukozyten als Grenzwert für Kandidatengene angewendet. Lediglich sieben der Kandidatengene, Claudin 7, Crystallin alpha B, E74-like Faktor 3, *Solute Carrier Family Member 1*, ATPase 8B, *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) und *Coagulation Factor III* zeigten eine ausreichende Sensitivität des Nachweises zirkulierender Tumorzellen (**P19, 20**).

Im zweiten Abschnitt des Projektes wurde dann die Korrelation des Nachweises von mRNA der sieben selektierten Gene mit dem Auftreten von Metastasen in klinischen Blutproben untersucht (**P21**). Dazu wurden insgesamt 120 Blutproben von Hündinnen

mit metastasierenden Karzinomen, nicht-metastasierenden Karzinomen und Adenomen untersucht. Crystallin alpha B zeigte sich von diesen als sensitivster und spezifischster Einzelmarker mit einer Sensitivität bzw. Spezifität der Identifikation von Blutproben von Hündinnen mit metastasierenden Karzinomen von 35 % bzw. 100 %. Aufgrund der geringen Spezifität der Einzelmarker wurde in einem zweiten Ansatz die Sensitivität bzw. Spezifität verschiedener Kombinationen der Einzelmarker analysiert. Von diesen zeigte eine Kombination aus Claudin 7, Crystallin alpha B, ATPase 8B und EGFR eine Sensitivität von 78 % und eine Spezifität von 80 % und somit eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber dem besten Einzelmarker, wenn auch auf Kosten der Spezifität (**P21**).

Insgesamt konnten im beschriebenen Projekt somit sieben Marker zum Nachweis von kaninen zirkulierenden Milchdrüsentumorzellen identifiziert werden. Der Nachweis dieser Marker im peripheren Blut korrelierte signifikant mit dem metastatischen Verhalten der Tumoren der betroffenen Hündinnen. Somit ermöglichen die entwickelten PCR-Assays erstmalig in der veterinärmedizinischen Onkologie einen Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut. Sowohl diagnostisch-prognostisch als auch für das grundlegende Verständnis der metastatischen Kaskade kaniner Milchdrüsenzellen könnten die entwickelten Marker somit einen wichtigen nächsten Schritt ermöglichen.

2.5 Reflexion der malignen Progression im Proteom

Hypothese 5: *Der Vergleich der Proteome von normaler Milchdrüse, Milchdrüsenadenomen und metastasierenden Milchdrüsenkarzinomen zeigt kontinuierliche lineare Proteinexpressionsveränderungen, die mit einer malignen Progression vereinbar sind (P23).*

Viele der diagnostischen und therapeutischen Probleme mit kaninen Milchdrüsentumoren ergeben sich vor allem aus dem bisher nur rudimentären Verständnis der grundlegenden Ursachen der molekularen Veränderungen in den Tumorzellen und der Ursache-Wirkungsbeziehung bzw. chronologischen Abfolge der Veränderungen. Wie bereits einleitend dargestellt, ist es bisher unklar, ob maligne, metastasierende Milchdrüsentumoren das Ergebnis einer kontinuierlichen, malignen Progression von nicht-neoplastischem Milchdrüsengewebe, über gutartige Adenome hin zu lokal invasiven Karzinomen und letztlich zu metastasierenden Karzinomen sind. In der bisher einzigen Studie zu diesem Thema postulierten Sorenmo und Kollegen, dass aufgrund des größeren Durchmesser maligner Tumoren und des höheren Alters betroffener Hündinnen maligne Tumoren immer aus gutartigen Tumoren entstehen (Sorenmo 2009). Diese

Beobachtungen konnten in unserer Tumorkohorte zumindest in Bezug auf die Tumorgroße nicht bestätigt werden. So zeigte sich eine große Varianz der Tumorgroße ohne ersichtliche Korrelation mit der Malignität der Tumoren, wobei metastasierende Tumoren häufig eine relativ geringe Größe aufwiesen (Klopffleisch, unveröffentlicht). Weiterhin ist das Argument des höheren Alters betroffener Hündinnen als nur unzureichend fundiert anzusehen. So könnten indirekte Effekte, wie z.B. eine generelle Altersassoziierte Akkumulation von Mutationen im Genom nicht-neoplastischer Milchdrüsenzellen oder eine Abnahme der Effizienz der immunologischen Überwachung der Tumoren die direkte Entstehung oder Fortentwicklung maligner Tumorzellen fördern. Weiterhin finden sich im Bereich der molekularen onkologischen Forschung zunehmend Befunde, dass zumindest für einige Tumorarten wie zum Beispiel den humanen Brustkrebs das metastasierende Potenzial der Tumoren bereits in sehr frühen Phasen ihrer Entwicklung festgelegt ist (van 't Veer 2002). Gutartige Tumoren und Adenokarzinome der Milchdrüse könnten somit voneinander unabhängige, selbstständige Entitäten und nicht aufeinander folgende Stadien der Tumorentwicklung darstellen.

Zur Prüfung der Hypothese einer malignen Progression mit linearen, kontinuierlichen Proteinexpressionsveränderungen vom Normalgewebe zum Karzinom wurde das Proteom von nicht-neoplastischer Milchdrüse, Adenomen, nicht-metastasierenden Karzinomen und metastasierenden Karzinomen mittels der 2-dimensionalen differentiellen Gelelektrophorese (2D-DIGE) verglichen. Die anhand dieser Fluoreszenz-basierten Proteomanalysemethoden nachgewiesenen Proteine wurden anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert. Insgesamt konnten 48 Proteine mit signifikant unterschiedlicher Expression in den hypothetischen Stufen der malignen Expression identifiziert werden (**P22**). Diese Proteine folgten dabei drei relevanten Expressionsmustern vom Normalgewebe zum metastasierenden Karzinom. Dreizehn Proteine folgten dem hier als „Adenom-Muster“ bezeichneten Expressionsverlauf, welcher eine stufenweise Zu- oder Abnahme der Proteinexpression vom Normalgewebe zum Adenom bei konstanter Proteinexpression auf den folgenden Stufen der malignen Progression umfassten. Neun Proteine folgten dem hier als „Karzinom-Muster“ bezeichneten Expressionsverlauf, welcher eine stufenweise Veränderung der Expression zwischen dem Stadium des Adenoms und des nicht-metastasierenden Karzinoms umfasste. 21 Proteine folgten letztlich dem hier als „Metastasierungs-Muster“ bezeichneten Expressionsverlauf, welcher eine stufenweise Zu- oder Abnahme der Proteinexpression von der Stufe des nicht-metastasierenden zum metastasierenden Karzinom umfasste, davor aber ein konstantes Expressionsniveau über alle Stufen der malignen Progression zeigte. Keines der Proteine mit signifikant differentieller Expression in den Stufen zeigte hingegen

eine kontinuierliche lineare Zu- oder Abnahme der Expression über alle bzw. mehr als eine Stufe der malignen Progression (**P22**).

Die Ergebnisse führten somit zu einer Ablehnung der Ausgangshypothese. Vielmehr fand sich eine einmalige, stufenweise Zu- oder Abnahme der Proteinexpression für alle untersuchten Proteine und zwar in jeweils sehr proteinspezifischem, individuellem Ausmaß. Das „Je mehr desto besser“-Prinzip scheint sich somit nicht für den Zusammenhang zwischen Proteinexpression und Malignität von kaninen Milchdrüsentumoren zu bestätigen. Vielmehr scheint das Erreichen eines bestimmten Proteinexpressionsniveaus für alle nachfolgenden Stufen der malignen Entwicklung ausreichend zu sein. In Bezug auf die zu prüfende Hypothese, wonach es sich bei der Karzinogenese kaniner Milchdrüsentumoren um einen kontinuierlichen Prozess der malignen Progression handelt, sind die Ergebnisse der Studie jedoch nicht eindeutig. So könnte die stufenweise Veränderung des Proteinexpressionsmuster eine Reflexion der Akquise supprimierender oder aktivierender Mutationen im Rahmen einer malignen Progression darstellen. Andererseits könnten die unterschiedlichen Proteinexpressionsniveaus unter Nichtberücksichtigung des hypothetisch angenommenen linearen Zusammenhangs auch hinweisend für eine grundsätzlich eigene Biologie der verschiedenen Dignitätsstufen kaniner Milchdrüsentumoren sein. Letztlich kann die Frage nach der malignen Progression kaniner Milchdrüsentumoren möglicherweise nur unter Beachtung und Beobachtung der zeitabhängigen Veränderungen im gleichen Tumors abschließend geklärt werden, wobei sich zahlreiche, momentan nicht lösbare, experimentelle und ethische Probleme bei entsprechenden Versuchsansätzen ergeben würden.

2.6 Eigene Publikationen zu Milchdrüsentumoren im Rahmen dieser kumulativen Habilitation (*Publikationen 1-22*)

Im Folgenden sind die für diesen Teil der Arbeit zugrunde liegenden Originalpublikationen in der chronologischen Reihenfolge ihrer Erstnennung im vorhergehenden Kapitel angeordnet.

- P1. **Klopfleisch R**, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD (2011). *Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. Vet Pathol 48:98-116, doi: 10.1177/0300985810390826*
- P2. **Klopfleisch R**, Gruber AD (2012). *Transcriptome and proteome research in veterinary science: what is possible and what questions can be asked? TSWJ 2012:254962, doi: 10.1100/2012/254962*

- P3. **Klopffleisch R**, Klose P, Gruber AD (2010). The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. *Vet Pathol* 47:446-454, doi: 10.1177/0300985810363904
- P4. **Klopffleisch R**, Gruber AD (2009). Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. *Vet Pathol* 46:416-422, doi: 10.1354/vp.08-VP-0212-K-FL
- P5. **Klopffleisch R**, Schütze M, Gruber AD (2010). RAD51 protein expression is increased in canine mammary carcinomas. *Vet Pathol* 47:98-101, doi: 10.1177/0300985809353310
- P6. **Klopffleisch R**, Gruber AD (2009). Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Res Vet Sci* 87:91-96, doi: 10.1016/j.rvsc.2008.12.010
- P7. **Klopffleisch R**, Schütze M, Gruber AD (2010). Downregulation of transforming growth factor beta (TGFbeta) and latent TGFbeta binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours. *Vet J* 186:379-384, doi: 10.1016/j.tvjl.2009.09.014
- P8. **Klopffleisch R**, Schütze M, Gruber AD (2010). Loss of p27 expression in canine mammary tumors and their metastases. *Res Vet Sci* 88:300-303, doi: 10.1016/j.rvsc.2009.08.007
- P9. **Klopffleisch R**, Hvid H, Klose P, da Costa A, Gruber AD (2010). Insulin receptor is expressed in normal canine mammary gland and benign adenomas but decreased in metastatic canine mammary carcinomas similar to human breast cancer. *Vet Comp Oncol* 8:293-301, doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00232.x
- P10. Hvid H, Ekstrom CT, Vienberg S, Oleksiewicz MB, **Klopffleisch R** (2011). Identification of stable and oestrus cycle-independent housekeeping genes in the rat mammary gland and other tissues. *Vet J* 190:103-108, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.09.002
- P11. Hvid H, **Klopffleisch R**, Vienberg S, Hansen BF, Thorup I, Jensen HE, Oleksiewicz MB (2011). Unique expression pattern of the three insulin receptor family members in the rat mammary gland: dominance of IGF-1R and IRR over the IR, and cyclical IGF-1R expression. *JAT* 31:312-328, doi: 10.1002/jat.1627
- P12. Mabrok HB, **Klopffleisch R**, Clavel T, Blaut M, Loh G (2012). Lignan transformation by gut bacteria lowers tumor burden in a gnotobiotic rat model of breast cancer. *Carcinogenesis* 33:203-208, doi: 10.1093/carcin/bgr256
- P13. **Klopffleisch R**, Gruber AD (2009). Derlin-1 and stanniocalcin-1 are differentially regulated in metastasizing canine mammary adenocarcinomas. *J Comp Pathol* 141:113-120, doi: 10.1016/j.jcpa.2008.09.010
- P14. **Klopffleisch R**, Schütze M, Linzmann H, Brunnberg L, Gruber AD (2010). Increased Derlin-1 expression in metastases of canine mammary adenocarcinomas. *J Comp Pathol* 142:79-83, doi: 10.1016/j.jcpa.2009.06.006
- P15. **Klopffleisch R**, Klose P, da Costa A, Brunnberg L, Gruber AD (2010). HEPACAM1 and 2 are differentially regulated in canine mammary adenomas and carcinomas and its lymph node metastases. *BMC Vet Res* 6:15, doi: 10.1186/1746-6148-6-15
- P16. **Klopffleisch R**, Lenze D, Hummel M, Gruber AD (2010). Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer* 10:618, doi: 10.1186/1471-2407-10-618
- P17. **Klopffleisch R**, Lenze D, Hummel M, Gruber AD (2011). The metastatic cascade is reflected in the transcriptome of metastatic canine mammary carcinomas. *Vet J* 190:236-243, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.10.018

- P18. **Klopfeisch R**, Klose P, Weise C, Bondzio A, Multhaup G, Einspanier R, Gruber AD (2010). Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: similarities to and differences from human breast cancer. *J Prot Res* 9:6380-6391, doi: 10.1021/pr100671c
- P19. da Costa A, Oliveira JT, Gartner F, Kohn B, Gruber AD, **Klopfeisch R** (2011). Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. *Vet J* 190:165-168, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.09.027
- P20. da Costa A, Lenze D, Hummel M, Kohn B, Gruber AD, **Klopfeisch R** (2012). Identification of six potential markers for the detection of circulating canine mammary tumour cells in the peripheral blood identified by microarray analysis. *J Comp Pathol* 146:143-151, doi: 10.1016/j.jcpa.2011.06.004
- P21. da Costa A, Kohn B, Gruber AD, **Klopfeisch R** (2012). Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. *Vet J* 196:34-39, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.08.021
- P22. Klose P, Weise C, Bondzio A, Multhaup G, Einspanier R, Gruber AD, **Klopfeisch R** (2011). Is there a malignant progression associated with a linear change in protein expression levels from normal canine mammary gland to metastatic mammary tumors? *J Prot Res* 10:4405-4415, doi: 10.1021/pr200112q

3 Kanine Mastzelltumoren

3.1 Offene Fragen

Die Diagnose und Prognosestellung kutaner Mastzelltumoren, einem der wichtigsten Tumoren des Hundes, basiert vor allem auf dem klinischen *Staging* und dem histologischen *Grading* (Welle 2008). Der histologische Grad wird dabei anhand der *Grading*-Systeme von Patnaik oder Kiupel bestimmt (Patnaik 1984; Kiupel 2011). Beide *Grading*-Systeme erlauben eine relativ ungenaue mittlere Überlebensprognose für den betroffenen Hund. Lediglich 6 % der Hunde mit Grad III-Tumoren überlebten länger als 50 Monate nach primärer Diagnose, während Hunde mit *high grade*-Tumoren eine durchschnittliche Überlebenszeit von circa 4 Monaten hatten (Patnaik 1984; Kiupel 2011). Unabhängig vom *Grading*-System sind maligne Tumoren durch hochgradig pleomorphe, entdifferenzierte Tumorzellen gekennzeichnet und zeigen ein invasives Wachstum in die umgebenden Gewebe sowie eine finale Fernmetastasierung (Welle 2008). Die molekularen Mechanismen hinter diesen klinisch und morphologisch zu beobachtenden Eigenschaften maligner Tumoren sind nahezu unbekannt. So ist im Gegensatz zu den Befunden bei anderen hämatopoetischen Tumoren, wie kaninen und feline Lymphomen und kutanen Histiozytomen, eine mögliche virale Ursache für die Tumoren oder der klonale Charakter kaniner Mastzelltumoren unbekannt (**P23, P24, P25**)

Die meisten der bisher durchgeführten Studien zur Karzinogenese kaniner Mastzelltumoren befassten sich mit dem Einfluss von Mutationen des Stammzellfaktor-Rezeptors KIT auf das biologische Verhalten der Tumoren (Webster 2004; Webster 2006). Unter den zahlreichen bisher beschriebenen *kit*-Mutationen konnte bisher lediglich für eine Tandemduplikation im Bereich des Exon 11 ein Einfluss auf das klinische Verhalten der Tumoren gesichert nachgewiesen werden (Zemke 2002; Webster 2006; Webster 2007). Letztlich tragen jedoch nur 9–17 % aller Mastzelltumoren diese Mutation, so dass weitere Mechanismen zur Entstehung und zum malignen Verhalten kaniner Mastzelltumoren beitragen müssen (Zemke 2002; Letard 2008; Welle 2008). Es sollte in der vorliegenden Arbeit somit folgende Hypothese geprüft werden:

Hypothese 6: *Kanine Mastzelltumoren mit geringem und hohem histologischen Grad unterscheiden sich in spezifischen Proteinexpressionsmustern.*

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CD25 ein zuverlässiger Marker zur Abgrenzung nicht-neoplastischer Mastzellen von neoplastischen Mastzellen der humanen systemi-

schen Mastozytose ist (Hayes 2006). Humane neoplastische Mastzellen zeigen eine konstante Expression des CD25, während nicht-neoplastische kutane und alimentäre Mastzellen dieses Oberflächenmolekül nicht exprimieren. Ähnliche Expressionsmuster finden sich auch für das T-Zelladhäsionsmolekül CD2, welches ebenfalls als Marker neoplastischer humaner Mastzellen genutzt wird (Schneider 1969). Beide Marker werden deshalb momentan von der WHO auch als *Minor Diagnostic Criteria* zur Diagnose der systemischen Mastozytose des Menschen empfohlen (Misdorp 1991; Horny HP 2008). Ähnliche Untersuchungen gibt es für den Hund nicht. Die Etablierung ähnlicher Marker könnte jedoch eventuell, insbesondere für hochgradig entdifferenzierte kanine Mastzelltumoren eine verbesserte Diagnostik ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb folgende Hypothese geprüft werden:

Hypothese 7: *Neoplastische und nicht-neoplastische kanine Mastzellen unterscheiden sich in ihrer Expression von CD25 und CD2.*

CD25 ist die alpha-Untereinheit des membranständigen Interleukin 2-Rezeptors (IL-2R) und wird physiologisch hauptsächlich von regulatorischen T-Lymphozyten exprimiert (Sorenmo 2000). Funktionell spielt CD25 zusammen mit den anderen beiden Untereinheiten, beta und gamma, des IL-2R eine wichtige Rolle bei der Bindung des Interleukin 2 (IL-2). Die Bindung des IL-2 an seinen Rezeptor ist eines der wichtigsten Signale für die T-Zellproliferation, -aktivierung und das Überleben von Lymphozyten (Malek 2008; Wang 2009). Eine Expression aller Untereinheiten und damit des voll funktionsfähigen IL-2R auf neoplastischen Mastzellen wurde bisher für noch keine Spezies beschrieben. Aufgrund des pro-proliferativen Effekts des IL-2R-Signals auf Leukozyten würde deshalb der Nachweis der Expression des Rezeptors auf kaninen neoplastischen Mastzellen einen völlig neuen Ansatz für die Theorie der Mastzelltumorkarzinogenese ermöglichen. Abhängig von den Ergebnissen der Untersuchung von Hypothese 7 ergab sich somit für das hier beschriebene Projekt folgende weiterhin zu untersuchende Hypothese:

Hypothese 8: *Alle Untereinheiten des IL2-R und IL2 werden auf kaninen Mastzelltumoren exprimiert und ihre Interaktion hat eine pro-proliferative Wirkung auf diese Tumorart.*

Für circa 15 % aller kaninen Mastzelltumoren bzw. 35 % der hochgradigen Mastzelltumoren wurde eine aktivierende Tandemduplikation im Exon 11 des KIT als Ursache für die Tumorentstehung postuliert (Zemke 2002; Letard 2008; Welle 2008). Ob und wie diese Mutation zu einer erhöhten Proliferation der Tumoren führt, ist bisher nicht bekannt. Die KIT-Signalkaskade wurde bereits in verschiedenen Spezies genauer untersucht (Masson 2009), die Zielgene des aktivierten KIT im kaninen Genom wurden je-

doch noch nicht identifiziert. Für ein Verständnis der grundlegenden Mastzelltumorbiologie und mögliche neue Therapieansätze sind diese Zusammenhänge jedoch von essentieller Bedeutung. Es ergab sich somit folgende weitere zu prüfende Hypothese:

Hypothese 9: *Mastzelltumoren mit und ohne Mutation des kit-Gens unterscheiden sich in ihren globalen Proteinexpressionsmustern.*

Als Konsequenz der Beobachtung, dass zumindest ein Teil der Mastzelltumoren durch eine dauerhafte Aktivierung des KIT zur Proliferation stimuliert wird, wurden Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) als Zytostatika bei der Behandlung von kaninen Mastzelltumoren eingeführt (Hahn 2008). So konnte gezeigt werden, dass TKI zumindest initial zu einer stark reduzierten Proliferation der Tumorzellen durch eine relativ spezifische Hemmung des kaninen KIT führt (Hahn 2008; Hahn 2010). Eine Hemmung des KIT durch TKI führt somit zu einer Veränderung der Expression der Zielgene von KIT. Eine experimentelle Inhibierung des KIT in Mastzellen mit mutiertem *kit* sollte damit den Nachweis potenzieller Zielgene und Wirkmechanismen der KIT-Signalkaskade erlauben. Aus diesen bisherigen Zusammenhängen ergab sich somit folgende zu prüfende Hypothese:

Hypothese 10: *Eine Inhibierung des KIT führt zu spezifischen Änderungen in RNA- und Proteinexpressionsmustern in neoplastischen Mastzellen.*

3.2 Tumorgrad- und KIT-Mutations-abhängige Proteinexpression

Hypothese 6: *Kanine Mastzelltumoren mit geringem und hohem histologischen Grad unterscheiden sich in spezifischen Proteinexpressionsmustern (P25).*

Zur Identifikation der Proteinexpressionsunterschiede von kaninen Mastzelltumoren mit niedrigem und hohem histologischem Grad wurden die zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) und die Massenspektrometrie verwendet. Die Untersuchung von *high-* versus *low grade*-Tumoren mit variablem *kit*-Mutationsstatus identifizierte dreizehn Proteine mit signifikant unterschiedlicher Expression in *high grade*-Mastzelltumoren (**P26**). Diese umfassten die vier Stressantwortproteine *Heat Shock Protein A9*, die Proteindisulfidisomerase A3, das T-Komplex Protein 1A und das T-Komplex Protein 1E. Weiterhin wurden die mit erhöhter Zellmotilität und Metastasierung assoziierten Proteine *WD Repeat Domain 1*, *Annexin A6*, *A2* und *das Actin-related Protein 3* differenziell in *high grade*-Mastzelltumoren exprimiert. Die histologisch nachweisbare Entdifferenzierung der Tumorzellen in hochgradigen Tumoren wurde durch den

Nachweis einer verminderten Expression der Mastzelltryptase reflektiert. Basierend auf diesen Ergebnissen kann somit hypothetisiert werden, dass *high grade*-Mastzelltumoren eine höhere Stressresistenz zeigen als *low grade*-Mastzelltumoren, unabhängig vom *kit*-Mutationsstatus. Weiterhin ist bemerkenswert, dass einige der identifizierten Proteine, wie zum Beispiel *Heat Shock Protein A9*, in der Humanonkologie als potenzielle Therapietargets angesehen werden (Pilzer 2010). Es scheint somit möglich, dass zum Beispiel *Heat Shock Protein*-Inhibitoren auch bei kaninen Mastzelltumoren eine therapeutische Wirkung haben könnten. Weiterhin scheint die erhöhte Zellmotilität kaniner Mastzelltumorzellen von Bedeutung für die Malignität der Tumoren und somit ein wichtiges Ziel für die Therapie der Tumoren zu sein.

3.3 Der Interleukin-2-Rezeptor als Malignitätsmarker

Hypothese 7: *Neoplastische und nicht-neoplastische kanine Mastzellen unterscheiden sich in der Expression von CD25 und CD2. (P26)*

Hypothese 8: *Alle Untereinheiten des IL2-R und IL2 werden auf kaninen Mastzelltumoren exprimiert und ihre Interaktion hat eine pro-proliferative Wirkung auf diese Tumorart. (P27)*

Zur Beantwortung der Frage, ob sich kanine Mastzelltumoren, wie humane Mastzelltumoren, von nicht-neoplastischen kutanen Mastzellen durch eine Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD2 unterscheiden, wurde eine umfassende Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression mittels quantitativer PCR, Immunfluoreszenz und Immunhistologie durchgeführt. Zunächst konnte mittels Immunfluoreszenz eine ausschließliche Expression des CD25-Proteins in neoplastischen kaninen Mastzellen, jedoch nicht in nicht-neoplastischen, ruhenden kutanen Mastzellen nachgewiesen werden (**P27**). Interessanterweise fand sich jedoch in Hautbiopsien von Hunden mit allergischer Dermatitis und somit aktivierten Mastzellen eine kleine Population von CD25-positiven kutanen, möglicherweise aktivierten Mastzellen. Weiterhin war eine Abnahme der CD25-Expression mit zunehmendem Tumorgad auffällig. Im Gegensatz dazu zeigten sich keine Unterschiede bei der Untersuchung der mRNA-Expression von CD2 zwischen *low*- und *high grade*-Mastzelltumoren. CD25, jedoch nicht CD2, erscheint somit ein potenzieller Marker für kanine neoplastische Mastzellen zu sein, wobei jedoch die verminderte Expression in *high grade*-Mastzelltumoren die Anwendbarkeit des Markers stark einschränkt.

In Bezug auf die Frage der kompletten Expression aller Untereinheiten des IL-2R und des Liganden IL-2 wurden an der gleichen Tumorkohorte ebenfalls Untersuchungen zur

Genexpression der Beta- und Gamma-Untereinheit des IL-2R durchgeführt. Dabei konnte eine Expression beider Untereinheiten in 86 % der Tumoren festgestellt werden (P28). Weiterhin exprimierten 68 % der Tumoren auch den zugehörigen Liganden IL-2. Interessanterweise zeigte sich wiederum eine ähnlich abnehmende Expression der IL-2R-Untereinheiten mit zunehmender Malignität der Tumoren und in Tumoren mit Tandemduplikation im Exon 11 des *kit*. Die Expression und möglicherweise die proliferative Aktivität des IL-2-Signales scheinen somit in der frühen Phase der Mastzelltumorentwicklung eine potenzielle Rolle spielen zu können. In hochgradigen, malignen Tumoren scheint zumindest für die Mehrheit der Tumorzellen kein Einfluss des IL-2 auf die Zellproliferation zu bestehen.

3.4 Zielgene des KIT-Rezeptors in neoplastischen Mastzellen

Hypothese 9: Mastzelltumoren mit und ohne Mutation des *kit*-Gens unterscheiden sich in ihren globalen Proteinexpressionsmustern. (P28)

Hypothese 10: Eine Inhibierung des KIT führt zu spezifischen Änderungen in RNA- und Proteinexpressionsmustern in neoplastischen Mastzellen. (P29)

Ein Vergleich der globalen Proteinexpression in kaninen Mastzelltumoren mit und ohne *kit*-Mutation mittels 2-dimensionaler differenzieller Gelelektrophorese (2D-DIGE) identifizierte 15 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine in *high grade*-Mastzelltumoren (P29). Dabei handelte es sich wiederum vorrangig um Proteine des Zytoskeletts und der Zellmotilität wie *Actin-related Protein 2* und das Muskel-Z-Linie-Protein CAPP1, Proteine pro-proliferativer Signalkaskaden wie das *Rho GDP Dissociation Inhibitor Protein Alpha* und Proteine des Fettstoffwechsels wie der Arachidon-15-Lipoxygenase und der Langkettenfettsäure-CoA-Ligase 1. Die kontinuierliche KIT-Aktivierung zeigt somit vor allem einen Einfluss auf den Stoffwechsel und die Zellmotilität. Insgesamt erschien die Zahl der unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen Mastzelltumoren mit und ohne Tandem-Duplikation in Exon 11 jedoch überraschend gering, wenn davon ausgegangen wird, dass das KIT-Signal eines der wichtigsten Proliferationssignale der Mastzelle sein soll. Möglicherweise scheint hier eine Inhomogenität der Mastzelltumoren in Bezug auf ihre Proteinexpression die Identifikation signifikanter Gruppenunterschiede verhindert zu haben.

Die Annahme, dass das KIT-Signal einer der wichtigsten Stimuli für neoplastische Mastzellen darstellt, konnte in einem weiteren Projekt zur Identifikation potenzieller Zielgene des KIT-Rezeptors bestätigt werden. In diesem Versuch wurde eine kanine Mastzelltumorzelllinie mit Tandem-Duplikation im *kit* mit dem TKI Masitinib[®] behandelt,

die Proliferations- und Stoffwechselaktivität sowie die globale mRNA- und Proteinexpression in den Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung untersucht (P30). Dabei zeigten sich in weniger als 12 Stunden ein nahezu kompletter Proliferationsstopp und eine signifikante Reduzierung der Stoffwechselaktivität der behandelten Zellen. Weiterhin konnten signifikante Veränderungen in der Expression von circa 3500 Genen oder 16 % des kaninen Genoms nachgewiesen werden, was nahezu dem kompletten aktiven Säuger genom entspricht (Osborne 2004). Die betroffenen Gene umfassten deshalb auch nahezu alle Zellfunktionen, wobei eine besonders starke Akkumulation von Genen der B- und T-Zellrezeptorkaskaden auffällig war. Weiterhin war eine zunehmende Überexpression von Genen aus alternativen, pro-proliferativen Signalkaskaden nach 24 und 72 Stunden Masitinib®-Behandlung auffällig. Im Gegensatz zu den Transkriptomanalysen identifizierte die Proteomanalyse nur 24 Proteine mit differenzieller Expression nach 24 bzw. 72 Stunden Behandlung mit Masitinib®. Die Unterschiede in der Anzahl betroffener Gene zwischen Transkriptions- und Proteinebene könnte dabei auf die verminderte generelle Stoffwechselaktivität behandelter Zellen und die kurze Behandlungszeit zurückzuführen sein.

Durch die beschriebenen Untersuchungen konnten somit *in vitro* der starke Einfluss und die komplexe Rolle des KIT-Signals auf kanine Mastzellen bestätigt werden, während im Gegensatz dazu die Untersuchungen *ex vivo* einen relativ geringen Unterschied zwischen mutierten und nicht mutierten Tumoren zeigte. Insbesondere die Änderung des Expressionsniveaus des nahezu kompletten aktiven kaninen Genoms zeigt beeindruckend, wie abhängig zumindest die kultivierten Mastzelltumorzellen vom aktiven KIT sind. Weiterhin gibt die zunehmende Expression von verschiedenen pro-proliferativen Signalkaskaden nach drei Tagen Masitinib®-Behandlung erste Hinweise auf die molekularen Mechanismen der in der Klinik beobachteten Rezidivierung von Mastzelltumoren unter Masitinib-Behandlung nach initialem Behandlungserfolg. Diese Mechanismen könnten deshalb die Basis für potenzielle Therapieziele für eine Kombinationstherapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren darstellen.

3.5 Eigene Publikationen zu Mastzelltumoren im Rahmen dieser kumulativen Habilitationsschrift (*Publikationen 23-30*)

Im Folgenden sind die für diesen Teil der Arbeit zugrunde liegenden Originalpublikationen in der chronologischen Reihenfolge ihrer Erstnennung im vorhergehenden Kapitel angeordnet.

- P23. Weiss AT, **Klopffleisch R**, Gruber AD (2010). Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *J Fel Med Surg* 12:929-935, doi: 10.1016/j.jfms.2010.07.006
- P24. Weiss AT, **Klopffleisch R**, Gruber AD (2011). T-cell receptor gamma chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *J Comp Pathol* 144:123-134, doi: 10.1016/j.jcpa.2010.08.001
- P25. Delcour NM, Klopffleisch R, Gruber AD, Weiss AT (2013). Canine cutaneous histiocytomas are clonal lesions as defined by X-linked clonality testing. *J Comp Pathol, Epub* 2013, doi: 10.1016/j.jcpa.2013.01.004.
- P26. Schlieben P, Meyer A, Weise C, Bondzio A, Einspanier R, Gruber AD, **Klopffleisch R** (2012). Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet J* 194:210-214, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.04.002
- P27. Meyer A, Gruber AD, **Klopffleisch R** (2012). CD25 is expressed by canine cutaneous mast cell tumors but not by cutaneous connective tissue mast cells. *Vet Pathol* 49:988-997, doi: 10.1177/0300985812439215
- P28. Meyer A, Gruber AD, **Klopffleisch R** (2012). All subunits of the interleukin receptor 2 are expressed on canine cutaneous mast cell tumors. *J Comp Pathol*, doi: 10.1016/j.jcpa.2012.11.232
- P29. Schlieben P, Meyer A, Weise C, Bondzio A, Einspanier R, Gruber AD, **Klopffleisch R** (2012). Tandem duplication of KIT exon 11 influences the proteome of canine mast cell tumours. *J Comp Pathol Epub Aug 2012*, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.04.002
- P30. **Klopffleisch R**, Meyer A, Schlieben P, Bondzio A, Weise C, Lenze D, Hummel M, Einspanier R, Gruber AD (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: 10.1016/j.tvjl.2012.04.002

4 Kanine kutane Weichgewebssarkome

4.1 Offene Fragen

Die Bezeichnung kutane kanine Weichgewebssarkome umfasst eine ganze Gruppe von Tumoren des Hundes, die durch eine Proliferation von spindelförmigen Zellen in der Haut charakterisiert sind (Withrow 2007). Dabei umfasst die Bezeichnung auch Tumore, die möglicherweise aus unterschiedlichen Ursprungszellen wie Fibrozyten oder peripheren Nervenscheidenzellen entstehen. Die Abgrenzung der verschiedenen Spindelzelltumoren erfolgt derzeit ausschließlich anhand ihrer histologischen Morphologie. Fibrosarkome sind im Idealfall durch invasiv wachsende, spindelförmige, in verwobenen Faszikeln oder einem Fischgrätenmuster angeordnete Tumorzellen gekennzeichnet (Hendrick 1998). Im Gegensatz dazu sind periphere Nervenscheidentumoren (PNST) in ihrer prototypischen Form zumeist gut umschriebene Tumoren aus wellenartig in Bündeln, Palisaden und Wirbeln angeordneten Spindelzellen (Hendrick 1998). Während die meisten Fibrosarkome und PNST anhand dieser Kriterien gut abzugrenzen sind, finden sich jedoch regelmäßig Tumoren, welche anhand der WHO-Kriterien nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zuzuordnen sind. Die bisher bekannten immunhistologischen Marker wie das S100-Protein finden sich aufgrund ihrer ubiquitären und letztlich nicht differenzierenden Expression in PNST zunehmend in der Kritik (Maacke 2000). Weiterhin konnte die bisherige Ursprungszelle von PNST, aber auch von Fibrosarkomen, noch nicht mit letzter Sicherheit identifiziert werden. Aufgrund der Histomorphologie und der Ultrastruktur wird bisher angenommen, dass PNST entweder aus Schwann-Zellen oder interneuronalen Fibroblasten entstehen (Hendrick 1998). Derzeit fehlen spezifische Marker zur Untersuchung der Histogenese und somit ist es noch unklar, von welcher Ursprungszelle PNST letztlich abstammen. Auf der Basis des bisherigen Kenntnisstandes ergaben sich somit folgende zu prüfende Hypothesen:

Hypothese 11: *PNST und Fibrosarkome unterscheiden sich in der Expression spezifischer Gene.*

Hypothese 12: *In PNST und Fibrosarkomen unterschiedlich exprimierte Gene können als PCR-Marker histologisch definierte Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete PNST und Fibrosarkome unterscheiden.*

4.2 Differentielle mRNA-Expressionsmuster bei peripheren Nervenscheidentumoren versus Fibrosarkomen

Hypothese 11: *PNST und Fibrosarkome unterscheiden sich in der Expression spezifischer Gene. (P30)*

Hypothese 12: *In PNST und Fibrosarkomen unterschiedlich exprimierte Gene können als PCR-Marker histologisch definierte Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete PNST und Fibrosarkome unterscheiden. (P31, P32)*

Zur Identifikation potenzieller molekularer Marker zur Differenzierung von PNST und Fibrosarkomen wurden die globalen mRNA-Expressionsmuster beider Tumorarten mittels cDNA Mikroarray-Analyse miteinander verglichen. Dabei wurden prototypische, in allen histologischen Kriterien komplett dem von der WHO beschriebenen Bild entsprechende Tumoren ausgewählt (Hendrick 1998). Der Vergleich des Transkriptoms beider Tumorarten identifizierte 45 annotierte Gene mit signifikant unterschiedlicher Expression zwischen den beiden Tumorarten (**P31**). Von den 25 Genen mit höherer Expression in PNST, sind sieben Gene für ihre spezifische Expression in neuroektodermalen Geweben bekannt. So wird das zur GLI-Familie gehörende Zinkfingerprotein 1 vor allem im sich entwickelnden Gehirn und in Glioblastomen nachgewiesen (Shahi 2012). Ein weiteres Beispiel eines Gens mit höherer Expression in PNST ist das Kinesin-like Protein 1B (KIF1B), welches für den anterograden Transport von Vesikeln im neuronalen Axon verantwortlich ist (Bieche 1999). Insgesamt konnten die Untersuchungen somit die Hypothese der Histogenese peripherer Nervenscheidentumoren aus neuroektodermalem Gewebe unterstützen. Andererseits fanden sich unter den 20 Genen mit erhöhter Expression in Fibrosarkomen acht Gene mit bekannter Assoziation mit der Tumorkarzinogenese bei humanen Sarkomen (zusammengefasst in P30). Es ergab sich somit die Hypothese, dass diese Gene auch beim Hund eine wichtige Rolle in der Karzinogenese von Fibrosarkomen spielen.

Ausgehend von den Ergebnissen der Mikroarray-Analyse wurden im zweiten Teil des Projekts PCR-basierte Nachweismethoden zur Differenzierung von PNST und Fibrosarkomen anhand ihrer mRNA-Expression entwickelt. Um eine Untersuchung der Marker in einer möglichst großen Population von Tumoren durchführen zu können, wurden die PCR-Protokolle für den Nachweis von mRNA aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumorgewebeproben etabliert. Da die Formalinfixierung zu einer teils starken Fragmentierung der Nukleinsäuren führt (**P32**), wurde eine neue Extraktionsmethode für mRNA, miRNA und DNA aus FFPE-Geweben etabliert (**P33**). Wiede-

rum wurden Tumoren mit prototypischer Morphologie ausgewählt und auf die Expression von zehn der 45 Gene untersucht. Von diesen konnten die drei Gene *Four and a Half Limb*, *GLI Family Zinc Finger Proteins 1* und Tetranectin als potenzielle mRNA-Marker für die Differenzierung identifiziert werden (Publikation in Vorbereitung). So wies der PNST-Marker Tetranectin eine 85 %ige Spezifität und eine 83 %ige Sensitivität auf, während der Fibrosarkom-Marker FHL2 eine 63 %ige Spezifität und eine 92 %ige Sensitivität zeigte. Insgesamt zeigten die drei besten Marker insbesondere in Kombination somit eine relativ gute Sensitivität und Spezifität für die differenzierende Identifikation von PNST und Fibrosarkomen. Zieht man jedoch in Betracht, dass es sich bei den untersuchten Tumoren um histologisch klar identifizierbare Prototypen ihrer Gruppen handelte, erscheint die Histologie immer noch als das bessere Diagnostikum zur Identifikation von PNST.

4.3 Eigene Publikationen zu kaninen kutanen Weichgewebssarkomen im Rahmen dieser kumulativen Habilitationsschrift (*Publikationen 31-33*)

Im Folgenden sind die für diesen Teil der Arbeit zugrunde liegenden Originalpublikationen in der chronologischen Reihenfolge ihrer Erstnennung im vorhergehenden Kapitel angeordnet.

- P31. **Klopffleisch R**, Meyer A, Lenze D, Hummel M, Gruber AD (2012). *Canine cutaneous peripheral nerve sheath tumours versus fibrosarcomas can be differentiated by neuroectodermal marker genes in their transcriptome. J Comp 148:197-205, doi: 10.1016/j.jcpa.2012.06.004*
- P32. **Klopffleisch R**, Weiss AT, Gruber AD (2011). *Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. Histol Histopathol 26:797-810,*
- P33. Weiss AT, Delcour NM, Meyer A, **Klopffleisch R** (2011). *Efficient and cost-effective extraction of genomic DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Vet Pathol 48:834-838, doi: 10.1177/0300985810380399*

5 Übergreifende Diskussion

Tumoren stellen beim alternden Hund, wie auch beim Menschen, eine der häufigsten Krankheits- und Todesursachen dar. Die meisten Aspekte der Entstehung und Progression dieser Tumoren sind bisher unbekannt. Es steht jedoch zu vermuten, dass aufgrund des Alters-assoziierten, spontanen Auftretens dieser Tumoren viele Ähnlichkeiten in den grundlegenden molekularen Mechanismen zwischen den kaninen Tumoren und den homologen Tumorarten beim Mensch bestehen. Übergeordnetes Ziel der in dieser Arbeit beschriebenen Projekte war deshalb, die bisher schwache Wissensbasis über die molekulare Karzinogenese kaniner Milchdrüsentumoren, Mastzelltumoren und peripherer Nervenscheidentumoren als wichtige und häufige Tumoren des Hundes substantziell zu verbessern und somit auch eine bessere Einschätzung des Modellcharakters der kaninen Tumoren für ähnliche Erkrankungen des Menschen zu ermöglichen.

Momentan ist es mit den vorhandenen diagnostischen Mitteln bisher nur begrenzt möglich, nicht-metastasierende und metastasierende Milchdrüsenkarzinome voneinander abzugrenzen. So werden Diagnosen momentan vor allem anhand der histologischen Untersuchung von Tumorbiopsien vorgenommen, welche relativ einfach und ohne Einfluss auf das Verhalten der Tumoren gewonnen werden können (P34), zur Prognoseeinschätzung verwendet. Diese Herangehensweise führt jedoch nur zu relativ ungenauen und groben Schätzungen des zukünftigen biologischen Verhaltens kaniner Tumore. Weiterhin ist bisher völlig unbekannt, welche Gene bei der malignen Entartung von kaninen Milchdrüsentumoren eine Rolle spielen und in welcher chronologischen Folge die Prozesse der Tumorentstehung ablaufen. So stehen sich derzeit die beiden Hypothesen gegenüber, dass es sich bei dem Entstehungsprozess kaniner Milchdrüsentumoren entweder um eine kontinuierliche maligne Progression von normalem Gewebe zu Karzinomen handelt oder dass Adenome und Karzinome von Beginn ihrer Entstehung an getrennte Entitäten darstellen.

Für die Karzinogenese kaniner Mastzelltumoren ist bisher lediglich eine Tandemduplikation im Exon 11 des Stammzellrezeptors KIT als ätiologische Komponente bestätigt worden. Diese genetische Veränderung tritt jedoch nur in etwa 15 % aller Mastzelltumoren des Hundes auf. Es ist somit fraglich, welche anderen molekularen Mechanismen in den Mastzelltumoren ohne KIT-Mutation eine Rolle spielen. So ist auch unbekannt, worin sich Mastzelltumoren mit niedrigem und hohem histologischen Grad bzw. mit und ohne KIT-Mutation voneinander unterscheiden. Weiterhin ist die molekulare Funktionsweise des KIT in kaninen Mastzelltumoren bisher völlig unbekannt.

Kanine, kutane Weichgewebstumore stellen eine histologisch relativ homogene Tumorgruppe dar, was eine sichere Abgrenzung von zum Beispiel kaninen peripheren Nervenscheidentumoren und Fibrosarkomen teils schwierig gestaltet. Weiterhin ist aufgrund des Fehlens geeigneter Marker die Ursprungszelle beider Tumorzellen bisher nur theoretisch diskutiert.

Zur Beantwortung dieser bisher ungeklärten Fragen und Zusammenhänge wurden im Rahmen dieser Habilitation verschiedene Projekte durchgeführt: Zum Einen wurden das Transkriptom und Proteom sowie die miRNA-Expression metastasierender versus nicht-metastasierender Milchdrüsenkarzinome mittels cDNA-Mikroarray-Analyse, 2-dimensionaler differenzieller Gelelektrophorese und quantitativer PCR miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich beide Tumorformen anhand ihrer Genexpression klar unterscheiden und diagnostisch abgrenzen lassen. In einer Folgestudie wurde dann versucht, die differenzierenden mRNA- und Proteinmuster quantitativ auf ein für die veterinär-onkologische Praxis wirtschaftlich akzeptables Maß zu reduzieren. Weiterhin konnte eine stadienspezifische, stufenweise, jedoch keine lineare Änderung der Proteinexpression aller untersuchter Proteine über alle Stadien der hypothetischen malignen Progression nachgewiesen werden. Obwohl die Hypothese der malignen Progression für kanine Mammatumoren anhand dieser Befunde nicht komplett abgelehnt werden kann, so scheint doch zumindest die Kontinuität der malignen Progression auf Ebene der Moleküle stark in Frage gestellt.

In einem für die veterinärmedizinische Onkologie gänzlich neuen Ansatz wurden weiterhin RT-PCR-Assays für den Nachweis zirkulierender Tumorzellen entwickelt. Vier der identifizierten Gene zeigten dabei insbesondere im Multiplex-Ansatz eine hohe Spezifität und Sensitivität zum Nachweis von zirkulierenden kaninen Milchdrüsentumorzellen im peripheren Blut von Hündinnen mit metastasierenden Tumoren. In einem weiteren Projekt könnte nun der diagnostische Wert der identifizierten Marker in einer geblindeten prospektiven Studie überprüft werden. Sollte sich dabei ihre Effektivität bestätigen, so könnten sie als relativ einfache und kostengünstige ergänzende Marker die Diagnostik und Überwachung des Therapieerfolgs kaniner Milchdrüsentumoren substantiell verbessern.

Auf der Suche nach relevanten Faktoren der Karzinogenese kaniner Mastzelltumoren konnte CD25 als Marker neoplastischer kaniner Mastzellen identifiziert werden. Tumorzellen, jedoch nicht ruhende kutane Mastzellen, exprimierten weiterhin alle drei relevanten Untereinheiten des Interleukin-Rezeptors, was zur Erstellung der neuen Hypothese eines Einflusses der Interleukin 2-Stimulation auf die Entstehung von Mastzelltumoren

führte. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Zahl der Tumorzellen mit Expression des Rezeptors in *high grade*-Tumoren abnahm. Zumindest für maligne Tumoren erscheint somit die Relevanz der Aktivität des Rezeptors für die Proliferation und das Überleben fraglich.

Weiterhin konnten in einem Zellkulturmodell der Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung kaniner Mastzelltumorzellen die Zielgene des KIT identifiziert werden. Dabei zeigte sich vor allem eine reaktiv erhöhte Genexpression der T- und B-Zellrezeptor-Signalkaskade in den Tumorzellen nach längerer Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung. Diese Rezeptorkaskaden könnten somit potenzielle Therapieziele für eine Kombinationsbehandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren darstellen. Weiterhin konnten mittels Proteomanalyse Gene mit Einfluss auf die Stressresistenz und die Zellmotilität *high grade*-Mastzelltumoren identifiziert werden. Einige der so identifizierten Proteine stellen bereits identifizierte potenzielle Ziele für die Therapie von humanen Tumoren. Ein ähnliches Potenzial ist somit auch für kanine Tumoren festzustellen und in weiterführenden Studien genauer zu beleuchten.

Der Vergleich der Genexpression peripherer Nervenscheidentumoren und Fibrosarkome mittels cDNA-Mikroarray-Analyse führte zur Identifikation von wenigen, dafür offenbar hochrelevanten, differentiell exprimierten Genen zwischen beiden Tumoren. Für sieben Gene mit bekannter Expression in neuroektodermalen Geweben konnte eine Überexpression in peripheren Nervenscheidentumoren identifiziert werden. Weiterhin hatten acht Gene mit bekannter Funktion in der Karzinogenese humaner Sarkome eine signifikant erhöhte Genexpression in kaninen Fibrosarkomen. Aus diesen Genen wurden vier Marker zur Unterscheidung beider Tumoren entwickelt, die in Kombination eine Spezifität und Sensitivität von jeweils 80 % zeigen. Da es sich jedoch bei den hier untersuchten Tumoren um histologisch prototypische Tumoren handelte, stellt sich nun die Frage, ob es sich bei den histologisch ähnlichen Tumoren wirklich um eine homogene Population handelt oder ob diese zumindest molekularbiologisch separierbare Entitäten darstellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für die drei beim Hund häufigen und wichtigen Tumorarten Milchdrüsenkarzinome, Mastzelltumoren und kanine Weichgewebesarkome durch die Anwendung neuester molekularer Methoden in den Teilprojekten dieses Habilitationsprojekt zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen werden konnten. Diese Erkenntnisse wurden bereits in dieser Arbeit zum Teil für die Entwicklung neuer diagnostischer Ansätze genutzt und könnten somit in Zukunft zu einer verbesserten Differenzierung der Tumorarten und verbesserten Prognose des zu erwartenden

klinischen Verhaltens führen und somit einen wichtigen Schritt hin zu einer „personalisierten“ Tiermedizin in diesem Bereich darstellen (**P35**). Weiterhin bieten die zahlreichen identifizierten molekularen Faktoren der Karzinogenese der drei Tumorarten eine wichtige Grundlage zur Entwicklung neuer Therapieansätze und der Überwachung von Therapieerfolgen. Ähnliche Arbeiten sind nun auch für andere Tumorarten beim Hund denkbar.

5.1 Eigene Publikationen zum Risiko der Entnahme von Tumorbiopsien und der Entwicklung der personalisierten Tiermedizin (*Publikationen 34-35*)

Im Folgenden sind die für diesen Teil der Arbeit zugrunde liegenden Originalpublikationen in der chronologischen Reihenfolge ihrer Erstnennung im vorhergehenden Kapitel angeordnet.

- P34. **Klopfleisch R**, Sperling C, Kershaw O, Gruber AD (2011). *Does the taking of biopsies affect the metastatic potential of tumours? A systematic review of reports on veterinary and human cases and animal models.* *Vet J* 190:e31-42, doi: 10.1016/j.tvjl.2011.04.010
- P35. **Klopfleisch R** (2013). *Personalized medicine in veterinary oncology: Minimal residual disease and circulating tumour cells in dogs.* *Vet J* 195:263-264, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.10.001

6 Zusammenfassung

Obwohl Tumoren eine der häufigsten Krankheits- und Todesursachen des Hundes darstellen, sind die meisten Aspekte ihrer Entstehung und Entwicklung bisher unbekannt. Ziel der in dieser Arbeit zusammengefassten Projekte war es deshalb, vertiefende Einblicke in die molekulare Karzinogenese kaniner Milchdrüsentumoren, Mastzelltumoren und kaniner kutaner Weichgewebesarkome zu erhalten, die eine verbesserte Diagnostik und langfristig auch neue Therapieansätze ermöglichen könnten.

Mit den bisherigen diagnostischen Mitteln ist es momentan nur begrenzt möglich, die Metastasierung von Milchdrüsenkarzinomen vorherzusagen. Weiterhin sind die für die maligne Entartung dieser Tumorart relevanten Signalkaskaden und die meisten Aspekte ihrer Metastasierung bisher unbekannt. Mittels umfassender Transkriptom- und Proteomuntersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit komplexe mRNA- und Proteinexpressionsmuster zur Identifikation metastasierender Milchdrüsenkarzinome selektiert werden. Ebenfalls konnte eine stufenweise Änderung der Proteinexpressionsmuster über alle Stadien der malignen Progression von Milchdrüsenkarzinomen nachgewiesen werden. In einem für die veterinärmedizinische Onkologie neuen Ansatz wurden weiterhin Marker zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut entwickelt, welche die bisherige Diagnostik kaniner Milchdrüsentumoren verbessern könnten.

Für die Karzinogenese kaniner Mastzelltumoren ist bisher nur eine Mutation des Stammzellrezeptors KIT als ätiologische Komponente bestätigt worden. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich die Expression des Interleukin-2-Rezeptors als potenzieller Karzinogenesefaktor für Mastzelltumoren identifiziert werden. In einem Zellkulturmodell der Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung kaniner Mastzelltumorzellen konnten weiterhin zahlreiche Zielgene des KIT identifiziert werden. Unter diesen fanden sich verschiedene reaktiv erhöhte Signalkaskaden mit potenziell proliferationsaktivierender Funktion. Diese könnten somit potenzielle Therapieziele für eine effektivere Kombinationsbehandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren darstellen. Weiterhin konnten mittels globaler Proteomanalyse Gene mit Einfluss auf die Stressresistenz und die Zellmotilität von Mastzelltumoren identifiziert werden. Einige dieser Proteine stellen bereits identifizierte Therapieziele humaner Tumoren dar und könnten für kanine Mastzelltumoren ein ähnliches Potenzial besitzen.

Tumoren der Gruppe der kaninen, kutanen Weichgewebesarkome lassen sich allein anhand histologischer Kriterien nur schwer voneinander abgrenzen. Mittels cDNA-

Mikroarray-Analyse konnten in dieser Arbeit mRNA-Marker für periphere Nervenscheidentumoren eingegrenzt werden, deren Expression einen hochsensitiven und spezifischen Nachweis dieser Tumorart ermöglicht.

Insgesamt konnten somit für drei der häufigsten kaninen Tumorarten durch die Anwendung neuester molekularer Methoden zahlreiche neue Erkenntnisse zu den Faktoren ihrer Entstehung und ihrer Entwicklung gewonnen werden. Diese Erkenntnisse wurden zum Teil bereits in dieser Arbeit zur Entwicklung neuer diagnostischer Ansätze genutzt und könnten in Zukunft auch zu neuen Therapieansätzen für diese Tumorarten beitragen.

7 Summary

Cancer is one of the most important lethal diseases for dogs. Nevertheless, most aspects of the cause and development of canine cancer are still unknown. Aim of the projects included in this thesis was therefore to obtain deeper insights into the molecular carcinogenesis of canine mammary tumors, mast cell tumors and canine cutaneous soft tissue sarcomas, which may allow for an improved diagnosis and new therapeutic approaches in the future.

The prediction of metastatic disease of canine mammary carcinomas is difficult with the currently available diagnostic tools. Furthermore, carcinogenesis-associated signaling cascades and most aspects of their metastatic progress are unknown. In the present study, metastasis-associated, complex mRNA and protein expression patterns were identified using global transcriptome and proteome analysis. In addition, a stepwise change in the protein expression patterns during the different steps of malignant progression of canine mammary tumors was observed. In an approach new to veterinary oncology, markers for circulating tumor cells in the peripheral blood of dogs with canine mammary tumors were identified and may serve as additional tools for an improved diagnosis of this tumor type.

Mutations of the stem cell receptor KIT are the only confirmed etiologic factor for the development of canine mast cell tumors. In the present study, expression of the interleukin 2 receptor was identified as a potential factor of mast cell tumor carcinogenesis. In another project, numerous target genes of KIT were identified in a cell culture model of tyrosine kinase inhibitor treatment of mast cell tumors. These included several proliferative signaling cascades with increased expression after inhibitor treatment. These cascades can now be considered potential targets for a more efficient combination therapy with tyrosine kinase inhibitors. Global proteome analysis also identified genes with influence on the stress resistance and cell motility of canine mast cell tumors. Some of these genes are already therapy targets for the treatment of human tumors and may possess similar potential for canine mast cell tumors.

Canine cutaneous soft tissue sarcomas are difficult to be differentiated into their subgroups by histology alone. cDNA-microarray analysis performed in this study, however, identified several genes with specific expression in peripheral nerve sheath tumors and fibrosarcomas. RT-PCR assays for these genes were able to sensitively and specifically separate peripheral nerve sheath tumors from fibrosarcomas.

In summary, application of modern molecular methods revealed new insights into factors of carcinogenesis and development of three of the most important canine tumor types. These findings were already used for the development of new diagnostic tools in this study and may facilitate the development of new therapeutic approaches in the future. Similar work is well conceivable for other canine tumors or tumors of other species in subsequent projects.

8 Literatur

1. Alunni-Fabbroni, M, Sandri, MT, 2010. Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods* 50, 289-297.
2. Ambros, V, 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
3. Benjamin, SA, Lee, AC, Saunders, WJ, 1999. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary pathology* 36, 423-436.
4. Bieche, I, Nogues, C, Lidereau, R, 1999. Overexpression of BRCA2 gene in sporadic breast tumours. *Oncogene* 18, 5232-5238.
5. Brodey, RS, Goldschmidt, MH, Roszel, JR, 1983. Canine Mammary-Gland Neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19, 61-90.
6. Colozza, M, Azambuja, E, Cardoso, F, Sotiriou, C, Larsimont, D, Piccart, MJ, 2005. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Annals of Oncology* 16, 1723-1739.
7. el-Deiry, WS, Harper, JW, O'Connor, PM, Velculescu, VE, Canman, CE, Jackman, J, Pietenpol, JA, Burrell, M, Hill, DE, Wang, Y, et al., 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer research* 54, 1169-1174.
8. Gilbertson, SR, Kurzman, ID, Zachrau, RE, Hurvitz, AI, Black, MM, 1983. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary pathology* 20, 127-142.
9. Goldschmidt, M, Pena, L, Rasotto, R, Zappulli, V, 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology* 48, 117-131.
10. Hahn, KA, Legendre, AM, Shaw, NG, Phillips, B, Ogilvie, GK, Prescott, DM, Atwater, SW, Carreras, JK, Lana, SE, Ladue, T, Rusk, A, Kinet, JP, Dubreuil, P, Moussy, A, Hermine, O, 2010. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *American journal of veterinary research* 71, 1354-1361.
11. Hahn, KA, Ogilvie, G, Rusk, T, Devauchelle, P, Leblanc, A, Legendre, A, Powers, B, Leventhal, PS, Kinet, JP, Palmerini, F, Dubreuil, P, Moussy, A, Hermine, O, 2008. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 1301-1309.
12. Hayes, DF, Cristofanilli, M, Budd, GT, Ellis, MJ, Stopeck, A, Miller, MC, Matera, J, Allard, WJ, Doyle, GV, Terstappen, LW, 2006. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clinical Cancer Research* 12, 4218-4224.
13. Hendrick, M, Mahaffey, E, Moore, F, Vos, J, Walder, E, 1998. Tumors of fibrous tissues. In: *Histologic Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals*,. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC.

14. Horny HP, MD, Bennett J, et al., 2008. Mastocytosis. In, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., Lyon, France: IARC Press, pp. 54-63.
15. Kiupel, M, Webster, JD, Bailey, KL, Best, S, DeLay, J, Detrisac, CJ, Fitzgerald, SD, Gamble, D, Ginn, PE, Goldschmidt, MH, Stromberg, PC, Valli, VE, Weisbrode, SE, 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. *Veterinary pathology* 48, 147-155.
16. Lana, SE, Rutteman, GR, Withrow, SJ, 2007. Tumors of the Mammary gland. In: Withrow, S.J., Vail, D.M. (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology* Vol. 4. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 619-628.
17. Letard, S, Yang, Y, Hanssens, K, Palmerini, F, Leventhal, PS, Guery, S, Moussy, A, Kinet, JP, Hermine, O, Dubreuil, P, 2008. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research* 6, 1137-1145.
18. Maacke, H, Opitz, S, Jost, K, Hamdorf, W, Henning, W, Kruger, S, Feller, AC, Lopens, A, Diedrich, K, Schwinger, E, Sturzbecher, HW, 2000. Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *International Journal of Cancer* 88, 907-913.
19. Malek, TR, 2008. The biology of interleukin-2. *Annual review of immunology* 26, 453-479.
20. Masson, K, Ronnstrand, L, 2009. Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cellular signalling* 21, 1717-1726.
21. Misdorp, W, 1991. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta endocrinologica* 125 Suppl 1, 27-31.
22. Misdorp, W, Else, RW, Hellmén, E, Lipscomb, TP, 1999. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat., Vol. 7. Armed Forces Institute of Pathology, Washington.
23. Mol, JA, Selman, PJ, Sprang, EP, van Neck, JW, Oosterlaken-Dijksterhuis, MA, 1997. The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *Journal of Reproduction and Fertility* 51, 339-344.
24. Moulton, JE, Rosenblatt, LS, Goldman, M, 1986. Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Veterinary pathology* 23, 741-749.
25. Osborne, CS, Chakalova, L, Brown, KE, Carter, D, Horton, A, Debrand, E, Goyenechea, B, Mitchell, JA, Lopes, S, Reik, W, Fraser, P, 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature genetics* 36, 1065-1071.
26. Pantel, K, Brakenhoff, RH, 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nature reviews. Cancer* 4, 448-456.

27. Patnaik, AK, Ehler, WJ, MacEwen, EG, 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary pathology* 21, 469-474.
28. Pilzer, D, Saar, M, Koya, K, Fishelson, Z, 2010. Mortalin inhibitors sensitize K562 leukemia cells to complement-dependent cytotoxicity. *International Journal of Cancer* 126, 1428-1435.
29. Ressel, L, Millanta, F, Caleri, E, Innocenti, VM, Poli, A, 2009. Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Veterinary pathology* 46, 860-868.
30. Rivera, P, von Euler, H, 2011. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary pathology* 48, 132-146.
31. Sato, M, Yamzaki, J, Goto-Koshino, Y, Takahashi, M, Fujino, Y, Ohno, K, Tsujimoto, H, 2012. The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Veterinary journal*.
32. Schneider, R, Dorn, CR, Taylor, DO, 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* 43, 1249-1261.
33. Shahi, MH, Rey, JA, Castresana, JS, 2012. The sonic hedgehog-GLI1 signaling pathway in brain tumor development. *Expert Opin Ther Targets* 16, 1227-1238.
34. Smith, U, Gale, EA, 2009. Does diabetes therapy influence the risk of cancer? *Diabetologia* 52, 1699-1708.
35. Sorenmo, KU, Kristiansen, VM, Cofone, MA, Shofer, FS, Breen, AM, Langeland, M, Mongil, CM, Grondahl, AM, Teige, J, Goldschmidt, MH, 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and comparative oncology* 7, 162-172.
36. Sorenmo, KU, Rasotto, R, Zappulli, V, Goldschmidt, MH, 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary pathology* 48, 85-97.
37. Sorenmo, KU, Shofer, FS, Goldschmidt, MH, 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 266-270.
38. Stephens, PJ, Tarpey, PS, Davies, H, Van Loo, P, Salomon, AV, Borresen-Dale, AL, Richardson, AL, Campbell, PJ, Futreal, PA, Stratton, MR, 2012. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 486, 400-404.
39. van 't Veer, LJ, Dai, H, van de Vijver, MJ, He, YD, Hart, AA, Mao, M, Peterse, HL, van der Kooy, K, Marton, MJ, Witteveen, AT, Schreiber, GJ, Kerkhoven, RM, Roberts, C, Linsley, PS, Bernards, R, Friend, SH, 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.
40. Wang, J, Hua, H, Ran, Y, Zhang, H, Liu, W, Yang, Z, Jiang, Y, 2008. Derlin-1 is overexpressed in human breast carcinoma and protects cancer cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Breast cancer research* 10, R7.

41. Wang, J, Wicker, LS, Santamaria, P, 2009. IL-2 and its high-affinity receptor: genetic control of immunoregulation and autoimmunity. *Seminars in immunology* 21, 363-371.
42. Webster, JD, Kiupel, M, Kaneene, JB, Miller, R, Yuzbasiyan-Gurkan, V, 2004. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary pathology* 41, 371-377.
43. Webster, JD, Yuzbasiyan-Gurkan, V, Kaneene, JB, Miller, R, Resau, JH, Kiupel, M, 2006. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 8, 104-111.
44. Webster, JD, Yuzbasiyan-Gurkan, V, Miller, RA, Kaneene, JB, Kiupel, M, 2007. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary pathology* 44, 298-308.
45. Weigelt, B, Peterse, JL, van 't Veer, LJ, 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews. Cancer* 5, 591-602.
46. Welle, MM, Bley, CR, Howard, J, Rufenacht, S, 2008. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary dermatology* 19, 321-339.
47. Withrow, SJ, Vail, DM, 2007. Soft Tissue Sarcomas. In: Withrow, S.J., Vail, D.M. (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology* Vol. 4. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 225-249.
48. 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. *Veterinary pathology* 39, 529-535.

9 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Achim Gruber, der es mir überhaupt ermöglicht hat diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen. Ich danke ihm dabei vor allem für seine hervorragende mentorielle und motivationale Betreuung und nicht zuletzt für seine in der Anfangsphase der Arbeiten absolut essentielle finanzielle Unterstützung der Projekte.

Ich danke meinen Doktorranden und hier vor allem Patricia Schlieben, Anja Meyer und Afonso da Costa für ihren umfassenden und hervorragenden Beitrag zu den wissenschaftlichen Arbeiten und das gute Teamklima.

Ich danke dem ganzen Team der Tierpathologie für die das immer gute Arbeitsklima.

Ich danke meiner Familie und ganz besonders meiner Frau für die stetige Unterstützung, Rückendeckung, Ruhe und Geborgenheit.