
Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin

Epikrise epithelialer Neoplasien beim Hund

Epidemiologische, biochemische und
immunhistochemische Untersuchungen

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi
am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
vorgelegt von

Dr.med.vet. Jakob H. Walter

Berlin 1998

Jakob Walter

Epikrise epithelialer Neoplasien beim Hund

Epidemiologische, biochemische und immunhistochemische Untersuchungen

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der
Freien Universität Berlin

**Epikrise epithelialer
Neoplasien beim Hund
Epidemiologische,
biochemische und
immunhistochemische
Untersuchungen**

Habilitationsschrift zum Erlangung der Venia
legendi am Fachbereich Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von **Dr.med.vet. Jakob Walter**

• Berlin 1998 •

Though this be madness, yet there is method in't
Polonius, in Hamlet, Act II, Scene 2

Entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem
„Ockham's Razor“ – William von Ockham zugeschrieben

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
Literatur	3
2 LITERATURÜBERSICHT	6
2.1 Das Zytoskelett	7
Mikrofilamente	7
Myosin	8
Mikrotubuli	8
Intermediärfilamente	9
(Zyto)keratine	14
Grundzüge der Zytokeratinexpression	17
Vimentin	21
Desmin	21
Gliafilamente (GFAP, glial fibrillary acidic protein)	22
Neuronale Intermediärfilamente	23
Lamine	24
Koexpression von IF	24
Zytokeratin und Vimentin	24
Zytokeratin und GFAP	25
Zytokeratin und Neurofilament	26
Vimentin und GFAP	26
Verlust bzw. Fehlen und Neoexpression von IF	26
Literatur Zytoskelett	27
2.2 Sonstige Marker	50
Tumorantigene	50
Alpha-Fetoprotein (AFP)	50
Carcinoembryonales Antigen (CEA)	51
Prostatic specific antigen (PSA)	51
Kohlenhydrat-Tumormarker	51
Enzym-Marker	52
Neuronenspezifische Enolase (NSE)	52
Plazentare Alkalische Phosphatase (PLAP)	53
Prostatic Acid Phosphatase	53
Matrix Metalloproteinasen	54
Hormonrezeptoren	54
Tissue Polypeptide Antigen (TPA)	55
Epithelial Membran Antigen (EMA)	55
Chromogranin	55
S-100 Protein	55
Von Willebrand Faktor (Factor VIII related Antigen)	56
Literatur „Sonstige Marker“	57
2.3 Immunhistochemie	68
Theoretische Prinzipien der Immunhistochemie	68
Markersubstanzen und -systeme	72
Fluorochrome	72
Enzyme	72
Meerrettich-Peroxidase	73

Alkalische Phosphatase.	74
Glukoseoxidase.	74
Avidin-Biotin-Systeme	75
Dextranpolymer-Techniken.	75
Immunfärbetechniken	76
Immunfluoreszenz	76
Peroxidase anti-Peroxidase-Methode.	77
Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)	78
Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode)	79
Enhanced Polymer One-Step Staining (EPOS) und EnVision™-System	81
Methodik und Rahmenbedingungen der Immunhistochemie	81
Gewebebehandlung für die Immunhistochemie	82
Gewebefixation	82
Gefrierschnitte	82
Formaldehydfixierung	83
Mikrowellenfixierung	84
Weitere Fixationsmethoden	84
Entkalkung	84
„Demaskieren“ formalinfixierter Proben	85
Enzymatische Vorbehandlung	85
Antigen-Retrieval-Systeme	86
Mikrowellenvorbehandlung	86
Dampfdruckbehandlung	87
Objekträgervorbehandlung und Adhäsiva	88
Gebrauchsverdünnung der Seren	88
Zeiten, Temperaturen und pH	89
Unspezifische Färbung	89
Kontrollen	90
Standardisierung	91
Literatur Immunhistochemie	93
2.4 Proteinanalyse	103
SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	103
Proteinblotting	105
Färbung der Nitrocellulosemembran	105
Immunblotting	106
Literatur Proteinanalyse	106
3 INSGESAMT BENUTZTES MATERIAL UND EINGESETZTE METHODEN	109
Paraffinmaterial	109
Gefriermaterial	110
Elektronenmikroskopie	110
Immunhistochemie	110
Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	111
Immunblot (Western Blot).	111
Hard- und Software	111
Image Analyse.	112
Ad Zitation.	112
Literatur zu Material & Methoden	113

4	ERGEBNISSE	114
4.1	Neoplasien bei seziierten Hunden in Berlin (West)	115
	Einleitung	115
	Material und Methoden	116
	Ergebnisse und Diskussion	119
	Häufigkeit von Neoplasien bei Hunden im Sektionsgut	119
	Alter	122
	Geschlecht	123
	Rassenprävalenzen für Neoplasien	126
	Organverteilung der Neoplasien	128
	Lymphohämatopoetisches System	129
	Atmungstrakt	131
	Leber und Gallenblase	134
	Haut und Hautanhangsorgane	137
	Harntrakt	144
	Männliche Geschlechtsorgane	147
	Weibliche Geschlechtsorgane	149
	Tumore des Endokrinums	152
	Neoplasien des Binde- und Stützgewebes	155
	Verdauungstrakt	158
	ZNS	161
	Neoplasiearten	163
	Abschließende Betrachtung	168
	Literaturverzeichnis	170
4.2	Systemische, metastatische, eu- und heterotope Tumore des Herzens bei seziierten Hunden	188
	Einleitung	189
	Material und Methoden	190
	Ergebnisse	192
	Diskussion	197
	Literatur	201
4.3	Epidermis und Hauttumore	204
4.3.1	<i>Zytokeratine in der Epidermis des Hundes</i>	205
	Einleitung	205
	Material & Methoden	205
	Ergebnisse	208
	Diskussion	212
	Literatur	213
4.3.2	<i>Das Zytokeratinprofil caniner epithelialer Hauttumoren</i>	216
	Einleitung	216
	Material & Methoden	217
	Ergebnisse	218
	Diskussion	221
	Literatur	226
4.3.3	<i>Epitheliale Neoplasien des Hundes von Haut, kutaner Schleimhaut und Übergangsepithel:</i>	229
	Einleitung	230
	Material & Methoden	231
	Ergebnisse	231
	Diskussion	235
	Literatur	237

4.4 Zytokeratine der Mamma	239
Literatur	239
4.4.1 <i>Biochemische und immunhistochemische Charakterisierung von Zytokeratinen in normalen und neoplastischen caninen Mammageweben</i>	240
Einleitung	241
Material und Methoden	242
Ergebnisse	243
Diskussion	243
Literatur	246
4.4.2 <i>Detektion okkultter Metastasen von Karzinomen der Mamma in Lymphknoten</i>	248
Einleitung	248
Material und Methoden	249
Ergebnisse	251
Diskussion	259
Literatur	261
4.5 Zytokeratine caniner primärer Leberkarzinome	266
Einleitung	266
Material und Methoden	266
Ergebnisse	267
Diskussion	269
Literatur	271
5 DISKUSSION	273
Perspektiven	275
Literatur	276

- Anhang A: Immunhistochemische Protokolle
 Anhang B: Protokolle: SDS-PAGE und Immunblot
 Anhang C: Benutzte Antikörper
 Anhang D: Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung

Neoplastische Transformationen gehören mit zu den häufigsten Todesursachen beim Hund (u.v.a.: Cotchin 1959; Dobberstein 1953; Dorn et al. 1966; Eichelberg and Seine 1996; Eskens 1983; Gutsche 1964; MacVean et al. 1978; Priester and Mantel 1971; Priester and McKay 1980; Überreiter 1977). Trotz gesteigerter Bedeutung molekularbiologischer Methoden (z.B. Southern Blot, Polymerase Chain Reaction) in der Tumordiagnostik, stellt die morphologische Bestimmung der Histogenese und der Dignität von veränderten Zellen, Zellverbänden und Geweben weiterhin den wesentlichen und zentralen Untersuchungsschritt im Befunden und oft daraus folgend im Prognostizieren neoplastischer Prozesse dar. Bei gut differenzierten Geschwülsten kann in der Regel mit herkömmlichen Färbetechniken der morphologische Beziehungsnachweis zum Ursprungsgewebe geführt werden. Für eine beträchtliche Anzahl von Tumoren ist eine solche Zuordnung zuverlässig möglich. Sie bereitet jedoch in solchen Fällen Probleme, wo Tumorzellen weitgehend entdifferenziert sind, wo aberrante oder atypische Differenzierungsmerkmale vorliegen oder wo simultan Merkmale verschiedener Gewebetypen auftauchen, und somit die Zuordnung nicht eindeutig festzustellen ist. Solche Tumoren tauchen dann in den Befunden als Blastome, großzellige, kleinzellige, spindelzellige oder pleomorphe Neoplasien ohne weitere Spezifikationen oder manchmal auch noch als Retikulumzellsarkome auf. Weiterhin treten Zuordnungsprobleme auf, wenn Metastasen ohne Primärtumor gefunden werden. In solchen Fällen kann versucht werden, mit Hilfe von Enzymhistochemie und/ oder Elektronenmikroskopie nach gewebespezifischen Strukturen oder Gewebeprodukten zu suchen. Gerade bei Tumoren mit niedrigem Differenzierungsgrad mißlingt dies häufig, da im Rahmen des Differenzierungsverlustes offensichtlich zytoplasmatische Differenzierungsprodukte (zum Beispiel: Enzymmuster, Verhornung von Plattenepithel oder Sekretion von Drüsen) desorganisiert werden.

In den letzten Jahren konnte in erster Linie an Geweben des Menschen gezeigt werden, daß spezifische Strukturen des Zytoskeletts auch bei weitgehender Entdifferenzierung weiterhin nachweisbar bleiben (Osborn and Weber 1983; Quinlan et al. 1985). Dabei hat die Weiterentwicklung der Immunhistochemie, insbesondere seit Einführung der monoklonalen Antikörpertechnik (Köhler and Milstein 1975) in Verbindung mit Differenzierungs- bzw. Funktionsmarkern des Zytoskeletts, der morphologischen Diagnostik neue Anstöße gegeben, diesem Dilemma zu entkommen. Der große Vorteil dieser Methoden besteht darin, daß spezifische Marker auf der Basis der lichtmikroskopischen Morphologie in situ nachgewie-

sen werden können (Lobeck 1991). In der Humanpathologie hat der histodiagnostische Nachweis von Zytoskelettbestandteilen, speziell von Intermediärfilamenten, bereits eine sichere Grundlage (Altmannsberger 1988; Moll 1993), die beim Hund so noch nicht besteht. Mit der vorliegenden Arbeit soll daher der Versuch unternommen werden, an einem umfangreichen Tumormaterial die Verteilung von Intermediärfilamenten in caninen Neoplasien mit Hilfe immunhistochemischer und biochemischer Methoden zu untersuchen und zu klären, ob damit eine histogenetische Tumorableitung routinemäßig möglich ist. Voraussetzung für einen erfolgreichen Nachweis solcher Strukturen beim Hund ist allerdings, daß ein breites Spektrum von mit caninen Geweben kreuzreagierenden Antikörpern zur Verfügung steht, das in der Lage ist, neoplastisch transformierte und unveränderte Zellen zu erkennen, und das die eingesetzte Technik sicher und einfach durchführbar sowie reproduzierbar ist. Unter diesen Voraussetzungen können mit Hilfe der Immunhistochemie mit hoher Exaktheit und Treffsicherheit transformierte Zellen ihrem Ursprungsgewebe zugeordnet werden (Baumal et al. 1984; Denk 1986; Fritz et al. 1985; Imam and Taylor 1985).

Ein – wenn auch ungenaues – Maß für den zunehmenden Stellenwert der Immunhistochemie in der veterinärmedizinischen Tumordiagnostik ist der Anstieg der Publikationen, die sich mit Neoplasien beim Hund mittels immunhistochemischer Methoden beschäftigen. Literaturrecherchen in den Datenbanken der CAB

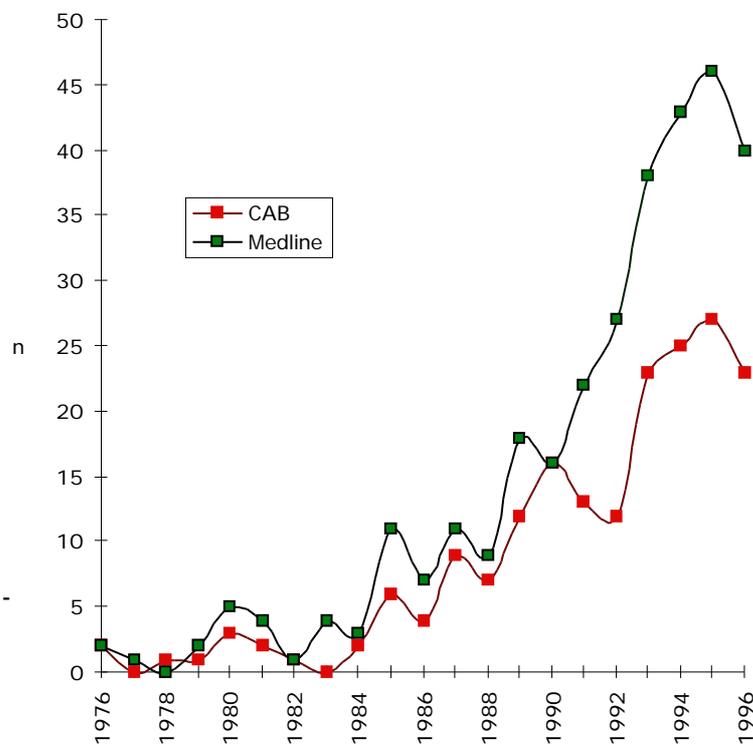


Abbildung 1–1

Veröffentlichungen, die sich mit immunhistochemischen Nachweisen in caninen Neoplasien beschäftigen; ausgewiesen in den Literaturdatenbanken CAB (auf VetCD) und Medline (bei DIMDI).

(Commonwealth Agriculture Bureaux International, Wallingford [UK]) enthalten auf den VetCD's (Veterinary Science on CD-Rom, CAB International¹ und in der Literaturdatenbank Medline (National Library of Medicine)² belegen dies eindeutig (Abbildung 1-1). Von 1976 bis einschließlich 1986 waren in den VetCD's lediglich 22 Quellen enthalten (Medline weist für diesen Zeitraum 40 Quellen aus), die sich mit immunhistochemischen Nachweisverfahren bei caninen Neoplasien beschäftigten. Von 1987 bis einschließlich 1990 fanden sich bereits 44 Quellen (in Medline werden 54 ausgewiesen) und seit 1990 bis 1996 schon 123 Zitate (in Medline 216).

Bedeutsam als morphologische „Tumormarker“ sind dabei neben den ubiquitär vorkommenden Intermediärfilamenten auch Zellprodukte, Oberflächenantigene oder Virusantigene. Adäquat dem Stellenwert der „Tumormarker“ ist die nachfolgende Darstellung des Standes der Wissenschaft als ausführliches Review zu Intermediärfilamenten und Immunhistochemie aufzufassen. Die Auswertung der Literatur zu speziellen Problemen finden sich in den jeweiligen Ergebniskapiteln.

Anliegen der vorliegenden Arbeit ist es somit, sich der Komplexität des Phänomens „Krebs“ des Hundes paradigmatisch zu nähern. Daher wurden zumeist retrospektiv unterschiedliche Tumorentitäten mit Hilfe traditioneller, biochemischer und immunhistochemischer Techniken untersucht, einheitlich (re)klassifiziert, Vorschläge zur Neoklassifizierung erarbeitet und versucht, für verschiedene Organsysteme typische Exprimierungsprofile zu erarbeiten.

Die spezielle Diskussion der Ergebnisse erfolgt in den entsprechenden Ergebniskapiteln; eine allgemeine (zusammenfassende) Diskussion wird im Kapitel 4 geführt.

Literatur

Altmannsberger, M. 1988. Intermediärfilamentproteine als Marker in der Tumordiagnostik. Edited by G. Seifert. Vol. 127, Veröffentlichungen aus der Pathologie (Progress in Pathology). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Baumal, R., H.J. Kahn, D Bailey, M.J. Phillips, and W. Hanna. 1984. The value of immunohistochemistry in increasing diagnostic precision of undifferentiated tumours by the surgical pathologist. *Histochemical Journal* 16:1061 - 1078.

Cotchin, E. 1959. Some tumours of dogs and cats of comparative veterinary and human interest. *Veterinary Record* 71:1040 - 1050.

¹Die Auswertung der VetCD's erfolgte mit Hilfe des Programms MacSpirs Version 2.4 (Silverplatter Information Retrieval System for the Apple Macintosh; Copyright by SilverPlatter International N.V) über einen Internetzugang zum CD-ROM-Server der Bibliothek des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin auf einer Apple Macintosh Quadra 660 AV.

²Die Recherche erfolgte online bei DIMDI (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information) in Köln; an dieser Stelle sei daher auch Herrn Rolf Schwahn von der Dokumentationsstelle für Veterinärmedizin der FU Berlin ausdrücklich für die Hilfestellung bei der Recherche gedankt.

- Denk, H. 1986. Morphologische Nachweismethoden: Methodisches Spektrum (Prinzipien, Mechanismen und Wertigkeit). *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 70:18 - 27.
- Dobberstein, J. 1953. Zur Statistik der Geschwülste bei Tieren. Vol. 3, Sitzungsbericht Deutsche Akademie der Wissenschaften. Berlin.
- Dorn, C. R., D. O. Taylor, L. E. Chaulk, and H. H. Hibbard. 1966. The prevalence of spontaneous neoplasms in a defined canine population. *American Journal of Public Health* 56:254-65.
- Eichelberg, H., and R. Seine. 1996. Lebenserwartung und Todesursachen bei Hunden. I. Zur Situation bei Mischlingen und verschiedenen Rassehunden. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 109:292-303.
- Eskens, U. 1983. Statistische Untersuchungen nach den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifizierte Geschwülste des Hundes unter besonderer Berücksichtigung der Mamma- und Hauttumoren. Inaugural-Dissertation, FB Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Fritz, P., J. Müller, G. Wegner, U. Braun, A. Grau, H.-V. Tuzcek, E. Moessner, and R. Schenk. 1985. Immunhistochemie: Theoretische Möglichkeiten, praktische Anwendungen. *Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie* 130:187 - 203.
- Gutsche, W. 1964. Sektionsstatistik der Hundekrankheiten aus dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover von 1938 bis 1963. Inaugural-Dissertation, Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Imam, A., and C.R. Taylor. 1985. Application of immunohistochemical methods in the diagnosis of malignant disease. *Cancer Investigation* 3:339-359.
- Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- Lobeck, H. 1991. Orthologie und Pathologie der Zytokeratine (Literaturübersicht – Antikörper). Überarbeitete Teile der Habilitationsschrift (1990), Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Rudolf Virchow – Standort Charlottenburg., Freie Universität, Berlin.
- MacVean, D.W., A.W. Monlux, P.S. Anderson, S.L. Silberg, and J.F. Roszel. 1978. Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology* 15:700 - 715.
- Moll, Roland, ed. 1993. Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren. Edited by G. Seifert. Vol. 142, Veröffentlichungen aus der Pathology (Progress in Pathology). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Osborn, M., and K. Weber. 1983. Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Laboratory Investigation* 48:372 - 394.
- Priester, W.A., and N. Mantel. 1971. Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 united states and canadian colleges of veterinary medicine. *Journal of the National Cancer Institute* 47:1333 - 1344.

- Priester, William A., and Frank W. McKay. 1980. *The occurrence of tumors in domestic animals*. Edited by J. L. Ziegler. Vol. 54, *National Cancer Institute Monograph*. Bethesda: National Institutes of Health.
- Quinlan, R.A., D.L. Schiller, M. Hatzfeld, T. Achstätter, R. Moll, J.L. Jorcano, T.M. Magin, and W.W. Franke. 1985. Patterns of expression and organization of cyto-keratin intermediate filaments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:282 - 306.
- Überreiter, O. 1977. *Klinische Krebsforschung bei Tieren*. Edited by M. Lerche, A. Mayr, H. Spörri and E. G. White. Vol. 27, *Fortschritte der Veterinärmedizin*. Berlin: Paul Parey.

2 Literaturübersicht

Im folgenden Kapitel wird zunächst ein aktueller Überblick über die Zusammensetzung des Zytoskeletts unter Hervorhebung der Intermediärfilamente gegeben. Daran schließt sich eine Übersicht über „Tumormarker“ an. Die letzten beiden Unterkapiteln beschäftigen sich mit Nachweismethoden – insbesondere mit der Immunhistochemie sowie mit Gelelektrophorese und Immunblotting.

2.1 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett, der biochemisch schwer lösliche Bestandteil jeder Eukaryontenzelle, besteht aus einem hochgradig strukturiertem dreidimensionalen Proteinnetzwerk, das sich i.d.R. aus vier morphologisch und funktionell unterschiedlichen Fasernsystemen sowie interzellulären Zellverbindungen (Desmosomen, Hemidesmosomen, Zonula adhaerens), Spectrinen und Kernlaminabestandteilen zusammensetzt, die elektronenmikroskopisch und immunhistochemisch visualisierbar sind (Schliwa 1986; Weber and Geisler 1985; Weber and Osborn 1982; Weber and Osborn 1986). Das Fasernsystem der Zelle besteht entsprechend der darstellbaren Struktur und Größe aus **Mikrofilamenten, Mikrotubuli, Myosinfilamente und Intermediärfilamente** (Baden, Glodsmith, and Fleming 1973; Luby-Phelps 1994; Schliwa 1986; Schliwa and J. 1981; Tezuka and Freedberg 1972). Nahezu alle Zellen enthalten Elemente dieser Zytoskelettkomponenten, allerdings in unterschiedlicher Mengen und Zusammensetzungen: Muskelzellen z.B. enthalten sehr viele Aktinfilamente, während Zellen mit Zilien, beispielsweise Bronchialepithel, viele Mikrotubuli enthalten.

Entsprechend ihrer Bedeutung als Differenzierungsmarker in der Tumordiagnostik werden im Folgenden nur die Intermediärfilamente ausführlicher besprochen.

Mikrofilamente

Mikrofilamente sind etwa 6 nm im Durchmesser bei einem Molekulargewicht von etwa 42.000 D. Das Hauptstrukturprotein der Mikrofilamente ist das fibrilläre Aktin (*F-Aktin*), das in sieben Isoformen exprimiert wird, die in Röntgenbeugungsbildern den Aufbau einer aus Monomeren bestehenden Helix zeigen (Amos 1985; Ishikawa, Bischoff, and Holtzer 1969; Lazarides and Hubbard 1976; Schliwa 1986). Diese Monomere sind globuläre Proteine (*G-Aktin*), die in Gegenwart von ATP zu fibrillärem Aktin (*F-Aktin*) polymerisieren (Ishikawa, Bischoff, and Holtzer 1969). Mikrofilamente liegen direkt unter der Zellmembran, wo sie sich von intrazellulär an den gleichen Molekülen anheften wie die Intermediärsubstanz von extrazellulär. Daneben findet man sie zentral in Mikrovilli; sie verbinden Zellkern, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Monomere und Polymere des Aktins sind in viele Zellfunktionen involviert: Bewegung, Zytokinese, Sekretion, Protein Sorting, mRNA-Lokalisierung, Signalübertragung und vieles mehr (Carlier and Pantaloni 1994; Stossel 1993). Mikrofilament-as-

soziierte Proteine, sogenannte Faktoren wie Sequestrierungs-, Verkappungs-, Spaltungs-, Stabilisierungs-, Bündelungs-, Gelierungs-, Abstandsfaktoren u.a., regulieren die Funktionszustände des Aktins (Schliwa 1981; Stossel et al. 1985). Darüber hinaus binden sich an das F-Aktin eine Vielzahl spezifischer Proteine (u.a. der "Bewegungsfaktor" Myosin, Myosinkinase, Tropomyosin, Filamin, -Aktinin, Talin, Troponin, Calmodulin, Vinculin und Villin), die der räumlichen Anordnung, der Stabilisierung der Zelle und des Nukleus, sowie der Zellbewegung und der Kontraktion dienen; über dies sind die Mikrofilamente an der Mitose beteiligt (Bulletin et al. 1988; Ishikawa, Bischoff, and Holtzer 1968; Lazarides and Hubbard 1976; Stossel et al. 1985).

Myosin

Myosin ist ein fibrilläres Makromolekül in Muskelzellen von etwa 150 nm Länge, einem Durchmesser von ca. 15-20 nm und ist das Produkt einer komplexen, phylogenetisch stark konservierten Multigenfamilie und weist dementsprechende Moleküldiversifizitäten auf (Silberstein et al. 1986; Swynghedauw 1986). Es ist das größte kontraktile Element der Muskelzellen und kommt darüber hinaus auch in anderen Zellen (Epithel, Myoepithel, Gehirngewebe) vor (Bandman 1985; Stratcher 1983; Weber and Osborn 1986; Whalen 1985).

Biochemisch ist Myosin ein Hexamer, das aus zwei schweren Myosin-Ketten (jeweils etwa 200.000 D) und vier leichten Myosin Ketten (jeweils ca. 18.000 bis 26.000 D) besteht, die Y-förmig angeordnet sind (Bandman 1985; Lowey and Risby 1971). Die vier leichten Ketten bilden zusammen mit den N-terminalen Enden der schweren Myosinketten globuläre Köpfe, die als Y-Arme herausragen, während die C-terminalen Enden der schweren Ketten als alpha-helikaler Schwanz den Stiel des Y bilden (Amos 1985; Bandman 1985; Elliot, Offer, and Burridge 1976; Huxley 1971; Lowey and Risby 1971; Ruppel and Spudich 1995; Stratcher 1983; Whalen 1985). Weitere Einzelheiten finden sich bei Stratcher (1983).

Mikrotubuli

Mikrotubuli finden sich mit Ausnahme der Erythrozyten in allen Säugetierzellen. Sie durchziehen als Strukturelemente arkadenförmig das Zytoplasma und nehmen in Eukaryonten eine Vielzahl von Funktionen wahr: Sie sind an der Zellstatik und -struktur, der Zellteilung, der Erhaltung der Zellhülle, Zilienbewegungen sowie am intrazellulärem Stofftransport beteiligt (Amos and Baker 1979; Gorbisky, Sammak, and Borisy 1988; Mandelkow and Mandelkow 1994; Mandelkow et al. 1995; Schliwa 1986; Vale, Scholey, and Sheetz 1986). Mikrotubuli sind im Zytoplasma, ausgehend vom sogenannten Mikrotubulusorganisationszentrum (Brin-

kley 1985; Joshi 1994; Kalt 1993), in Zentriolennähe und als spezifische Organellen in Zilien und Spermien zu finden (Gibbons 1981; Schliwa 1986; Schliwa and Van Blerkom 1981).

Das Hauptstrukturprotein der Mikrotubuli ist ein Globulin (Tubulin), das aus zwei helikal angeordneten Polypeptiden mit Molekulargewichten von jeweils etwa 50.000 D und 4 nm Durchmesser besteht, dem α - und β -Tubulin (Mandelkow et al. 1995; Wade and Chretien 1993). β -Tubulin, eine Komponente des Mikrotubulusorganisationszentrums, wirkt als Nukleationspunkt bei der Bildung der Mikrotubuli (Joshi 1994; Shu and Joshi 1995; Zheng et al. 1995), an der auch zytoplasmatische Chaperonkomplexe – Homologon des mitochondrialen Hitzeschockproteins – beteiligt sind (Yaffe et al. 1992). Während der Nukleation polymerisieren Heterodimere aus α - und β -Tubulin in Gegenwart von GTP und Mg^{++} zu ringförmigen Oligomeren aus, die zu Protofilamenten elongiert werden. Normalerweise vereinigen sich 13 Protofilamente zu einem elektronenmikroskopisch sichtbaren Hohlzylinder mit einem Durchmesser von ca. 25 nm und einem MG von 110.000 D (Schliwa 1986; Weber and Osborn 1986; Weber, Pollack, and Bibring 1975).

Zur Zeit sind eine Vielzahl verschiedener α - und β -Isoformen bekannt, die zum Teil organ- und zellspezifisch sind (Lewis, Gu, and Cowan 1987; Mandelkow and Mandelkow 1995). Beispielsweise kommt β_1 -Tubulin in hämato- und thrombo-poetischen Zellen, β_3 im Hoden und β_4 im Nervensystem vor (Lewis, Gu, and Cowan 1987; Little and Luduena 1985).

Intermediärfilamente (IF)

Intermediärfilamente mit einem Durchmesser von 7-11 nm, liegen in ihrer Größe zwischen (intermediär) Mikrotubuli und Mikrofilamenten. Erst Mitte der sechziger Jahre wurden diese Zellbestandteile zum erstenmal elektronenmikroskopisch dargestellt und entsprechend ihrer Größe als 10 nm (100 Å) Filamente angesprochen (Biberfeld et al. 1965; Ishikawa, Bischoff, and Holtzer 1968; Sternlieb 1965). Sie bilden den un- bzw. schwerlöslichen Anteil eukaryonter Zellen, der bis zu 50 % der Einzelzelle ausmachen kann. Ursprünglich wurden Intermediärfilamente als Varianten von Aktin oder Mikrotubuli angesehen; erst Ende der siebziger Jahre konnte gezeigt werden, daß sie neben Mikrotubuli und Mikrofilamenten die dritte Hauptkomponente des Zytoskeletts darstellen (Franke et al. 1978; Hynes and Destree 1978; Lazarides 1980; Lazarides 1981; Lazarides 1982; Lazarides and Hubbard 1976; Weber and Geisler 1982). IF sind aus fibrillären Proteinmolekülen aufgebaut, wobei die eigentliche Funktion der Intermediärfilamente immer noch unklar ist; sie nehmen wahrscheinlich neben Stabilisierungsaufgaben auch Regulations- und Signalübertragungsaufgaben wahr (Aebi et

al. 1988; Bauer and Traub 1995; Ishikawa, Bischoff, and Holtzer 1968; Ishikawa, Bischoff, and Holtzer 1969; Janmey et al. 1991; Lazarides 1980; Lazarides 1982; Traub et al. 1992; Traub and Shoeman 1994).

Mit Hilfe von rekombinanten DNA-Techniken sind die Nukleotide und dementsprechend die Aminosäuresequenzen von den meisten der heute bekannten IF gesichert. Mehr als 40 in ihren Sequenzen sich ähnelnden Polypeptidstränge sind am Aufbau der unterschiedlichen Intermediärfilamente beteiligt (Aebi et al. 1988; Steinert 1985; Steinert and Roop 1988; Weber and Geisler 1985). Allen Intermediärfilamenten ist als Produkt einer komplexen Multigenfamilie eine stabförmige Zentraldomäne gemeinsam. Diese hochkonservierte Struktur besteht aus i.d.R. 310-314 Aminosäuren in α -helikaler „coiled-coil“ Konformation von etwa 47-50 nm Länge mit globulären Domänen variabler Länge am NH_2 -Ende („Kopf“) und COOH -Ende („Schwanz“). Die Zentraldomäne besteht dabei aus sich wiederholenden heptadischen Aminosäuresequenzen (Conway and Parry 1988). Weiterhin wird die Hauptdomäne, wie Abbildung 2.1-1 zeigt, durch drei nichthelikale kurze Linker (L1, L2, L12) in vier unterschiedliche α -helikale „coiled-coil“ Segmente unterteilt (Geisler and Weber 1982; Steinert 1991; Steinert and Roop 1988; Weber and Geisler 1984). Von diesem allen Intermediärfilamenten gemeinsamen Aufbau scheinen lediglich die „schwanzlosen“ Intermediärfilamente Zytokeratin 19, Filensin und Phakinin abzuweichen (Merdes, Gounari, and Georgatos 1993). Über ihr N-terminales Kopfstück und ihr C-terminales Schwanzstück ist die Zentraldomäne mit weiteren hypervariablen Polypeptiden von unterschiedlichen Längen und Sequenzen verbunden, die wahrscheinlich aus der Filamentachse herausragen und deren Zusammensetzung eine Unterteilung in sechs Subtypen (siehe Tabelle 2.1-1) ermöglichen (Aebi et al. 1988; Fuchs and Weber 1994; Geisler and Weber 1986; Lazarides 1982; Osborn and Weber 1982; Steinert and Roop 1988; Stewart 1993; Weber and Geisler 1985).

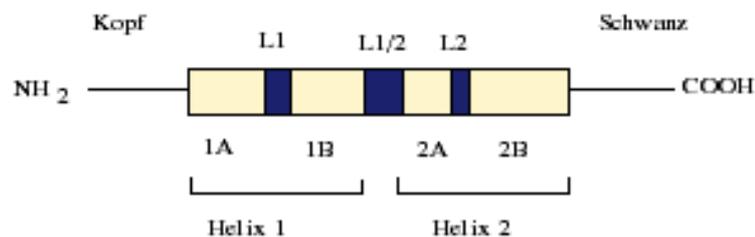


Abbildung 2.1-1

Schematische Darstellung der stabförmigen Zentraldomäne. Die α -helikale Zentraldomäne wird begrenzt durch einen nichthelikalen NH_2 -Kopf und durch einen nichthelikalen C-terminalen Schwanz. Die beiden Helixdomänen Helix 1 und 2 werden durch den Linker 1/2 unterteilt. Die Linker L1 und L2 verbinden die Helices 1A und 1B bzw. 2A und 2B.

Tabelle 2.1-1

Übersicht über die heute bekannten Subtypen der Intermediärfilamente und deren zellulärer Hauptherkunft.

Subtyp	IF-Protein	Zahl der Polypeptide	MG in kDa	Zelltyp
I	Zytokeratine A (sauer)	17	40–70	Epithel
II	Zytokeratine B (basisch)	13	52–68	Epithel
III	Vimentin	1	54	Mesenchym
	Desmin	1	52	Muskulatur
	Gliafilamente (GFAP)	1	53	Gliazellen, Astrozyten
	Peripherin	2	57	Neuronale PNS u. einige ZNS-Zellen
	Plasticin	1	53	Retinale Ganglion zellen
IV	Neurofilamente (NF-L, NF-M, NF-H)	3	68, 145, 200	ZNS- u. PNS Zellen
	α -Internexin	1	66	Neuronale ZNS-Zellen
V	Nukleäre Lamine A, B1, B2 und C	3	60, 67, 70	Zellkernmembran
VI	Nestin	1	200	Neuroepitheliale Stammzellen
unklar	Filensin/Phakinin	1	110	Linse

Die Sequenzhomologie der Zentralsdomäne der IF-Subtypen schwankt, obwohl ein Epitop allen IF gemeinsam ist (Pruss et al. 1981). So liegt die Sequenzidentität innerhalb der Subtypen I und II zwischen 25 % und 30 %, zwischen 60-90 % beim III und nahe 100 % beim Subtyp IV (Geisler, Kaufmann, and Weber 1982; Geisler, Kaufmann, and Weber 1985; Hanukoglu and Fuchs 1983; Steinert 1985; Steinert et al. 1983). Der Subtyp VI zeigt zu den anderen IF eine Aminosäureidentität zwischen 16-29 % (Lehndahl, Zimmermann, and McKay 1990). Filensin (MG=100kD) und Phakinin (MG=47 kD) sind beide IF-Proteine, die als obligate Heteropolymere in der Linse vorkommen, und im Verhältnis 1:3 polymerisieren (Merdes, Gounari, and Georgatos 1993; Remington 1993).

Es wird allgemein angenommen, daß die nukleären Lamine die Progenitoren der übrigen Intermediärfilamentklassen darstellen. Nach Genduplikation und Abspaltung von 6 heptadischen Wiederholungen entsteht aus Laminen der direkte IF-Progenitor, der einerseits nach weiterer Genduplikation den Subtyp III und nach Verlust von Intron-Exon-Strukturen neuronale IF bildet. Andererseits divergieren aus dem Progenitor die Keratinsubtypen und formen die Mitglieder der jeweiligen Subtypen I und II (Franke 1987; Geisler et al. 1993; Geisler, Schünemann, and Weber 1992; Zehner and Paterson 1985).

Der Zusammenbau der Intermediärfilamente scheint entsprechend den biochemischen Gesetzmäßigkeiten der Helixstruktur (Crick 1953; Pauling and Corey 1953) folgendermaßen abzulaufen (siehe auch Abbildung 2.1-2): Zwei Mono-

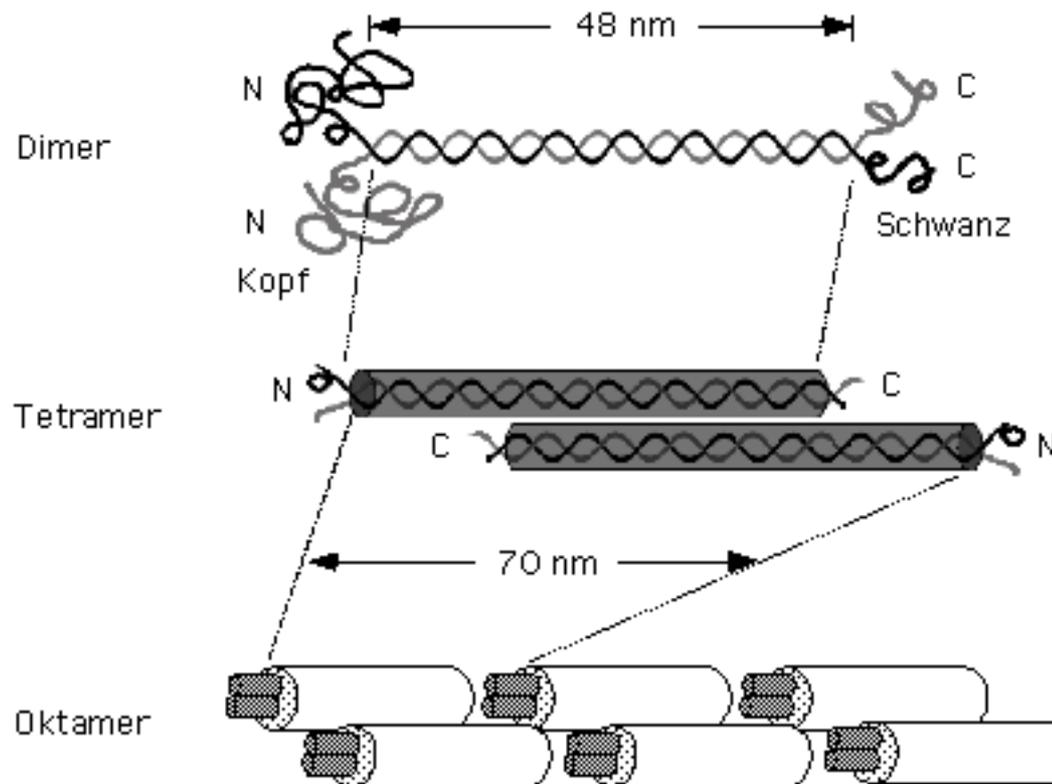


Abbildung 2.1-2

Schema des Zusammenbaus der Intermediärfilamente: Die primäre strukturelle Einheit ist das coiled-coil Dimer zweier Polypeptidstränge (das N-terminale Ende wird als Kopf, das C-terminale Ende als Schwanz bezeichnet). Durch antiparallele Aggregation wird ein Tetramer gebildet, das durch End-zu-End-Anlagerung zum Oktamer wird. Acht Oktamere bilden schließlich ein Intermediärfilament.

mere (parallel angeordnete, doppelsträngige – helikale Peptidketten) bilden ein „coiled coil“ **Dimer** von 44 bis 46 nm Länge (Aebi et al. 1988; Geisler, Kaufmann, and Weber 1982; Geisler, Kaufmann, and Weber 1985; Geisler, Schünemann, and Weber 1992; Geisler and Weber 1986; Hatzfeld and Franke 1985; Quinlan et al. 1985; Steinert 1991; Steinert 1993a; Steinert 1993b). Dieser Prozeß läuft spontan ohne exogene Energiezufuhr und ohne zusätzliche Kofaktoren ab. Je zwei Dimere lagern sich parallel oder antiparallel zu einem **Tetramer** (=Protofilament) von etwa 2-3 nm Durchmesser zusammen (Downing 1995; Geisler and Weber 1982; Quinlan et al. 1985; Steinert 1991). Zwei wahrscheinlich antiparallel und unterschiedlich versetzt gelagerte Protofilamente formen mittels ionischer Interaktionen ein **Oktamer** (=Protofibrille) von 4-5 nm Durchmesser aus (Aebi et al. 1988; Downing 1995; Geisler, Kaufmann, and Weber 1982; Geisler, Schünemann, and Weber 1992; Steinert 1993a; Steinert, Marekov, and Parry 1993; Steinert, Steven, and Roop 1985). Die Protofibrillen wiederum

kondensieren zu höheren **Oligomeren**, die schließlich zusammen zum Intermediärfilament polymerisieren (Aebi et al. 1988; Geisler, Kaufmann, and Weber 1982; Geisler, Schünemann, and Weber 1992; Geisler and Weber 1982; Heins et al. 1993; Steinert 1993b; Steinert and Roop 1988; Steinert, Steven, and Roop 1985; Stewart 1993; Stewart, Quinlan, and Moir 1989). Während die Zentraldomäne bei den nichtepithelialen Typen aus homopolymeren Filamenten gebildet werden, bestehen die epithelialen und die linsenspezifischen IF aus obligatorisch heteropolymeren Zentraldomänen, da jeweils ein Vertreter von I und II zum Zusammenbau benötigt werden (Merdes, Gounari, and Georgatos 1993; Weber and Geisler 1984; Weber and Geisler 1985).

Diese Befunde legen nahe, daß Intermediärfilamentproteine zwar aus mehr oder weniger unterschiedlichen Polypeptiden bestehen, insgesamt jedoch alle miteinander verwandt sind und somit einer komplexen Multigenfamilie angehören. Als gesichert scheint, daß Vimentin, Desmin, Peripherin und GFAP von jeweils einem Gen enkodiert werden, das dieselben Intron-Exon-Strukturen aufweist (Bloemendal et al. 1985; Traub, Kuhn, and Grub 1993) während von Zytokeratingenen mehrere Kopien vorhanden sind (Fuchs et al. 1987).

Intermediärfilamente treten in Form ihrer Subtypen mehr oder weniger streng gewebespezifisch auf (Tabelle 2.1-1), d.h. die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen ihrer Proteinuntereinheiten werden differenzierungsspezifisch exprimiert (Aebi et al. 1988; Gown and Vogel 1984; Gown and Vogel 1985; Osborn and Weber 1982; Weber and Geisler 1984). Während der embryonalen Entwicklungsphase werden bereits sehr früh als erste Intermediärfilamente die Zytokeratine CK 8, CK 18, CK 19 exprimiert (Jackson et al. 1980; Jackson et al. 1981; Santini et al. 1993). In nichtepithelialen Geweben wird oft initial Vimentin exprimiert, danach erscheinen differenzierungsspezifische IF und schließlich verschwindet Vimentin wieder. So zum Beispiel bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur: Myoblasten exprimieren zunächst Vimentin, dann Nestin; bei der weiteren Entwicklung wird Desmin nachweisbar und schließlich verschwinden Vimentin und Nestin (Cary and Klymkowsky 1994a; Cary and Klymkowsky 1994b; Sejersen and Lehndahl 1993).

Da ihr Proteinmuster auch in malignen Transformationen weitgehend erhalten bleibt (Hynes and Destree 1978; Moll 1993; Osborn and Weber 1982; Osborn and Weber 1983; Quinlan et al. 1985), hat der immunhistochemische Nachweis von Intermediärfilamenten eine besondere Bedeutung in der Tumordiagnostik erhalten. Unter anderem wird es damit möglich, Eigenarten und Eigenschaften eines bestimmten Tumors bestimmen zu können oder weitgehend entdifferenzierte Blastome oder Metastasen einem Ursprungsgewebe zuordnen zu können (Altmannsberger et al. 1984; Altmannsberger et al. 1981; Gabbiani, Kapanci, and Franke 1981; Gown and Vogel 1985; Osborn and Weber 1983; Ramaekers et al. 1983c;

Schlegel et al. 1980). Allerdings kann es im Verlauf der Transformation zu einer Reduktion oder zu einer Neoexpression kommen. Diese Expressionsänderungen laufen allerdings immer innerhalb eines bestimmten Differenzierungsspielraumes ab (Arai et al. 1994; Fuchs and Green 1980; Lobeck et al. 1986; Miettinen et al. 1982; Moll, Hage, and Thoenes 1991; Stosiek, Kasper, and Moll 1992).

Franke et al. (1979b) fanden in Zellkulturen unterschiedlicher Spezies (Mensch, Meerkatze, Rind, Hund, Kaninchen, Hamster, Ratte, Maus) eine weitgehend übereinstimmende Expression von Zytokeratinen und Vimentin. Ebenso konnten Geisler und Weber (1981) am Beispiel Mensch, Schwein und Huhn zeigen, daß die Gewebespezifität von Vimentin und Desmin größer ist als mögliche Speziesunterschiede.

(Zyto)keratine (CK)

Als Keratine wurden ursprünglich die Hauptproteine des verhornenden Epithels sowie epidermale Produkte wie Haare, Hornsubstanzen z.B. Nagel-, Klauen-, Huf- oder Krallenhorn, Hörner oder Wolle bezeichnet, die als α -Helix oder in Form von β -Faltblättern vorliegen (Rudall 1952). Unter "prekeratin" wurden die Tonofilamente in nicht verhornenden Epidermiszellen verstanden (Matoltsy 1964). Als Zytokeratine bezeichnete man die nichtepidermalen Keratine (Franke et al. 1978). Heute werden die Hauptbestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen in ihrer Gesamtheit synonym als Keratine oder Zytokeratine angesprochen.

Zytokeratinfilamente sind das Translationsprodukt einer äußerst heterogenen und komplexen Multigenfamilie und bestehen aus unterschiedlichen Polypeptiden mit Molekulargewichten zwischen etwa 40.000 und etwa 70.000 Dalton sowie isoelektrischen Punkten zwischen pH 5 und pH 8 (Fuchs and Weber 1994). Sie treten in (epithelialen) Zellen meistens paarweise auf und lassen sich entsprechend ihren Ladungsverhältnissen (Eichner, Bonitz, and Sun 1984; Schiller, Franke, and Geiger 1982), ihrer mRNA-Hybridisierung (Fuchs et al. 1981; Hanukoglu and Fuchs 1983; Kim, Rheinwald, and Fuchs 1983), ihres Peptidmusters (Moll et al. 1982a; Schiller, Franke, and Geiger 1982), ihrer Aminosäuresequenz (Hanukoglu and Fuchs 1983; Steinert et al. 1983; Steinert and Roop 1988) und ihrer Immunreaktionen (Eichner, Bonitz, and Sun 1984; Heid, Moll, and Franke 1988a; Heid, Moll, and Franke 1988b; Tseng et al. 1982) in zwei Unterfamilien einordnen:

- Die Subfamilie Typ I (sauer) enthält die Zytokeratine 9-20 mit Molekulargewichten zwischen 40 und 64 kDa bei isoelektrischen Punkten zwischen pH 4,8 und 6,1, sowie die Ha Keratine (z.B. Ha1-Ha4, Hax) der Haare und die

- **Subfamilie Typ II** (neutral-basisch), die die Zytokeratine 1-8 sowie die Hb Keratine (Hb1-Hb4, Hbx) der Haare enthält, mit Molekulargewichten zwischen 54 und 70 kDa bei isoelektrischen Punkten zwischen pH 5,8 und 8,0 (Aebi et al. 1983; Altmannsberger et al. 1981; Eichner, Bonitz, and Sun 1984; Franke et al. 1981; Fuchs et al. 1981; Heid, Moll, and Franke 1988a; Heid, Werner, and Franke 1986; Kim, Rheinwald, and Fuchs 1983; Moll et al. 1982a; Schiller, Franke, and Geiger 1982; Sun et al. 1985; Tseng et al. 1982).

Neben unterschiedlichen sogenannten „harten -Keratinen“, die typisch für epidermale Hornprodukte sind und die in verschiedenen Zungenpapillen sowie in einigen Retikulumzellen des Thymus vorkommen (Bowden et al. 1987; Heid, Moll, and Franke 1988a; Heid, Moll, and Franke 1988b; Heid, Werner, and Franke 1986; Lynch et al. 1984; Rogers et al. 1996) sind etwa 20 unterschiedliche „weiche -Keratine“ bekannt: Moll et al. (1982a; 1987) haben mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese einen Katalog von 20 (humanen) Zytokeratinen aufgestellt, indem sie die verschiedenen Keratine des Menschen von 1-20 durchnummerierten und damit eine allgemein akzeptierte Einteilung schufen. Ein ähnlicher Katalog ist für bovine Zytokeratine beschrieben (Quinlan et al. 1985; Schiller, Franke, and Geiger 1982). Die Keratine 1-8 werden dem basisch-neutralen Typ II, die Keratine 9-20 dem sauren Typ I zugeordnet (Tabelle 2.1-2). Mischke und Wild (Mischke and Wild 1987; Wild and Mischke 1986) erweitern diesen Katalog zunächst um polymorphe Varianten (1a/1b; 4a/4b; 5a/5b; 10a/10b/10c/ 10d) für Keratine des nicht-verhornenden Plattenepithels des oberen Verdauungstraktes sowie der Epidermis, wobei heute zum Teil mehrere Varianten der meisten Zytokeratine bekannt sind (Celis et al. 1994). Merdes et al. (1993) beschrieben ein zusätzliches Mitglied der Zytokeratine, das „schwanzlose“ Phakinin in der Linse: Phakinin ist ein 47 kD großes Zytokeratin, das wegen seiner Sequenzhomologie von über 31% dem Typ I zugeordnet werden muß und sich nur mit Filensin aber nicht mit Zytokeratinen von Typ I oder Typ II paart (Merdes, Gounari, and Georgatos 1993; Remington 1993).

Der strukturelle Aufbau der CK's gleicht prinzipiell dem aller IF's (Abbildung 2.1-3). Gemeinsam ist allen Zytokeratinen als Mitglieder der Intermediärfilamente die zentral angeordnete stabartige -helikale Domäne aus etwa 300 Aminosäuren mit einem MG von 38.000 D; sie enthält in ihren hypervariablen Regionen Glycin- und Serin-reiche Sequenzen (Quinlan et al. 1985; Steinert, Steven, and Roop 1985).

Während denaturierte IF's nichtepithelialer Herkunft in vitro in der Lage sind, sich aus singulären Polypeptiden zu vollständigen IF's zu renaturieren, benötigen Keratine dazu ein jeweils saures CK-Polypeptid mit relativ kleinem MG (Sequenztyp I), das sich mit einem basisches CK-Polypeptid mit relativ größerem MG (Sequenztyp II) paart. Das basische CK ist jeweils 7-10 kD größer als das

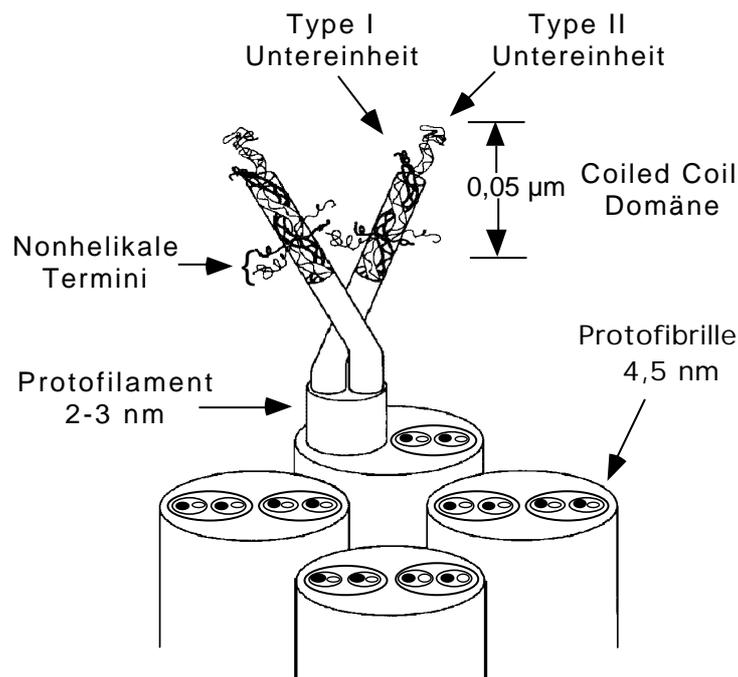


Abbildung 2.1-3

Dreidimensionales Modell der Zytokeratinfaser (Fuchs et al. 1987)

sauere. Diese sauer-basische Paarung wird auch *in vitro* aufrechterhalten (Hatzfeld and Franke 1985; Lee and Baden 1976; Steinert, Idler, and Zimmermann 1976; Sun et al. 1984; Sun et al. 1985). Erstaunlich ist die Tatsache, daß *in vitro* auch Kombinationen von solchen sauren/ basischen CK-Polypeptiden möglich sind, die *in vivo* nicht vorkommen: z.B. zwischen epidermalen und nichtepidermalen CK's. Es sind sogar heterologe Paarbildungen („promiscuity of cytokeratins“) möglich: z.B. kann das epidermale CK 9 vom Rind mit dem humanen nichtepidermalen CK 8 typische Zytokeratin-Komplexe ausbilden (Hatzfeld and Franke 1985). *In vivo* werden die Zytokeratine in gewebetypischen sauer/ basischen Kombinationen (Tabelle 2.1-2) exprimiert (Fuchs 1988; Moll et al. 1982b; Quinlan et al. 1985; Sun et al. 1984; Tseng et al. 1982). Eine Ausnahme von dieser Regel zeigt das CK 19. Dieses Zytokeratin kann sich *in vivo* unspezifisch mit jedem basischen CK paaren. CK 19 fällt auch dadurch aus der Reihe, daß es ein nur etwa 10 Aminosäuren langes COOH-Ende aufweist (Bader et al. 1986).

Während jeweils innerhalb der Subtypen I und II eine etwa 60 %ige Sequenzhomologie besteht, kann zwischen den Subtypen I und II nur eine von etwa 30 % beobachtet werden (Fuchs et al. 1985; Hanukoglu and Fuchs 1983; Steinert 1985; Steinert, Steven, and Roop 1985).

Grundzüge der Zytokeratinexpression

Die Expression der unterschiedlichen Zytokeratine ist einerseits mit dem Zelltyp andererseits mit dem Differenzierungsgrad des jeweiligen Epithels korreliert. Prinzipiell sind Plattenepithelkeratine von Zylinderepithelkeratinen zu unterscheiden.

- Die höhermolekularen Zytokeratine 1, 2, 4, 5, 6 vom Subtyp II und 9, 10, 11 (10b), 13, 14, 15, 16, 17 vom Subtyp I sind typisch für **Plattenepithelien** (mehrschichtige Epithelien). In nahezu allen Plattenepithelien finden sich die CK-Paare CK 5/14 oder 5/17 (Nelson and Sun 1983; Tseng et al. 1982), weshalb sie als Basis-CK der Plattenepithelien angesprochen werden können. CK 5/14 werden prinzipiell in der relativ undifferenzierten Basalschicht aller mehrschichtigen Plattenepithelien sowie in Myoepithelzellen gefunden. In mehrreihigen Epithelien wird zusätzlich CK 17 exprimiert. Die übrigen plattenepitheltypischen CKs können als Differenzierungsmarker aufgefaßt werden, die im Sinne eines Genswitches im Laufe der Differenzierung angeschaltet werden.
- Die niedrigermolekularen Zytokeratine 7, 8 des Subtyps II und 18, 19, 20 des Subtyps I sind typisch für **Zylinderepithelien** (einfache, kubische Epit-

Tabelle 2.1-2

Vereinfachte Klassifikation und Expression von humanen epithelialen Keratinpaaren (Bowden et al. 1987; Cooper, Schermer, and Sun 1985; Franke et al. 1981; Hatzfeld and Franke 1985; Moll 1987; Moll et al. 1982a; Moll, Schiller, and Franke 1990; Sun et al. 1985)

	Typ II basisch MG (kDa)	CK-Nr.		CK-Nr.	Typ I sauer MG (kDa)	Vorkommen
Plattenepithel	68	1		9	64	Epidermis und
	65,5	2		10a/b	56,5	verhornendes
	63	3		11	56	Plattenepithel
	59	4		12	55	Cornea
	58/60	5a/b		13	54	Orales Plattenepithel
				14	50/51	Grundkomponente Plattenepithel
				15	50	
	56	6		16	48	Hyperproliferative Keratoyten
		17	46	Myoepithel		
Zylinderepithel	54	7			Gangepithel (Bronchien, Urothel, Pankreas)	
	52,5	8	18	45	Grundkomponente Zylinderepithel	
			19	40	Magen-, Darm-, Bronchial-, Tubulusepithel	
			20	46	Urothel, Magen-, Darmepithel, Merkelzellen	

helien), wobei das CK-Paar 8/18 als Basis-CK der einfachen Epithelien aufgefaßt werden kann.

- CK 3 und 12 kommen nur im Corneaepithel vor,
- während sich in mehrreihigen Epithelien (z.B. respiratorisches Epithel) Kombinationen aus beiden Gruppen finden (Cooper, Schermer, and Sun 1985; Fuchs 1988; Moll et al. 1982b; Moll et al. 1987; Tseng et al. 1982).

In der **Epidermis** werden basal in den undifferenzierten Keratinozyten CK 5/14 exprimiert, direkt subbasal werden die CK 1, 10 und 11 angeschaltet, CK 2 und 9 in höheren Stratum spinosum Schichten an einigen Stellen der menschlichen Haut (Bowden et al. 1987; Collin et al. 1992; Fuchs and Green 1980; Mischke and Wild 1987; Woodcock-Mitchell et al. 1989). In belasteten Hautbereichen (z.B. Fußsohle) und bei Krankheiten, die mit Proliferation von Epidermiszellen einhergehen (z.B. Keratosen, Ichthyosis, Verrucae aber auch bei Wundheilung oder Basaliomen) werden die Keratinpaare 6 und 16 zusätzlich exprimiert (Mansbridge and Knapp 1987; Stoler et al. 1988; Sun et al. 1985; Weiss, Eichner, and Sun 1984). CK 9 ist das typische CK in der Leistenhaut sowie in der Epidermis von Handfläche und Fußsohle (Moll et al. 1982b; Quinlan et al. 1985; Sun et al. 1985).

In **Haarfollikel** werden neben den „harten“ Keratinen der Haare (Heid, Moll, and Franke 1988a; Heid, Moll, and Franke 1988b; Heid, Werner, and Franke 1986; Lynch et al. 1984; Rogers et al. 1996) die „weichen“ Zytokeratine 5, 6, 14, 16 und 17 sowie das epidermisspezifische Paar 1/10 exprimiert (Bowden et al. 1987; Moll et al. 1982b; Stark et al. 1990).

Ähnliches zeigt sich am **unverhornten Plattenepithel** – z.B. Mukosaepithel von Mundhöhle, Ösophagus, Zervix und Vagina – für das typischerweise als Reifungsmarker CK 4/13 gefunden werden (Lobeck et al. 1989; Lobeck et al. 1986; Moll et al. 1982b; Sun et al. 1985). Bei entzündlich-hyperplastischen Prozessen werden CK 6 übermäßig stark und CK 8, 18, 19 zusätzlich exprimiert (Lobeck et al. 1986; Wild, Lobeck, and Mischke 1987).

Die CK Nr. 1, 2, 10, 11, 14 und 19 lassen sich auch in Zungenpapillen zusammen mit „harten“ Keratinen nachweisen (Heid, Moll, and Franke 1988a; Heid, Moll, and Franke 1988b; Rentrop et al. 1986; Wong et al. 1994). In den nichtlymphoiden Stammzellen des Thymus inklusive den Hassallschen Körpern lassen sich ebenso neben „harten“ Keratinen die Zytokeratine 10, 11, 14, 14, 16 und 19 darstellen (Heid, Moll, and Franke 1988a; Laster et al. 1986; Moll et al. 1982a).

Die Expressionsgruppe der zylinderepitheltypischen (einfachen) Zytokeratine weist als ubiquitäres Basispaar CK 8/18 (Moll et al. 1982a) auf. Das Basispaar CK 8/18 ist in parenchymatösen Epithelien wie Hepatozyten, Pankreasazinus-

zellen, Nierentubuli das einzige CK-Paar. Additive Zytokeratine sind CK 7, das luminal in mehrreihigen Epithelien (z.B. Bronchialepithel) und im Urothel angeschaltet wird, das relativ weit verbreitete CK 19 (Moll et al. 1982a; Tseng et al. 1982), das u.a. in duktalem und gastrointestinales Epithelien und Urothel vorkommt, sowie CK 20, das in Darm- und Magenfoveolae Epithel exprimiert wird (Moll, Schiller, and Franke 1990; Moll et al. 1987). CK 19 kommt darüber hinaus auch in mehrreihigen Epithelien und sogar in Basalzellen unverhornter Plattenepithelien vor. CK 20 wird daneben auch in Merkelzellen der Haut exprimiert (Moll, Schiller, and Franke 1990).

Normale **Hepatozyten** des Menschen exprimieren die CK 8 und 18, **Gallengangszellen** neben CK 8 und 18 noch CK 7 und 19 (Denk and Lackinger 1986; Eyken and Desmet 1993; Eyken et al. 1987; Moll et al. 1982a). Leberzell-Karzinome können allerdings zusätzlich oder ausschließlich CK 7 und/oder 19 exprimieren (Balaton et al. 1988; Eyken et al. 1988; Fischer et al. 1987; Lai et al. 1989).

Bronchialepithel enthält CK (4), 5, (6), 7, 8, 13, 14, 17, 18 und 19, die **Alveolarepithelien** CK 7, 8, 18 und 19, wobei CK 19 typisch für reife **Alveolardeckzellen II** ist (Blobel et al. 1984; Broers et al. 1989; Moll, Blobel, and Franke 1984; Moll et al. 1982a; Paine et al. 1995).

In der **Mamma** werden CK 5, 7, 8, 14, (15), 17, (18) und 19 exprimiert: Luminal wird CK 8/18, basal werden CK5/14 und 5/17 gebildet (Altmannsberger et al. 1986; Altmannsberger et al. 1985a; Debus et al. 1984; Moll 1993; Moll et al. 1982a; Ramaekers et al. 1983b).

In den **Nieren** werden in den Tubulusepithelien die für einschichtige Epithelien typischen CK 8/18 gefunden. In den Sammelrohren, den Henle'schen Schleifen und in den Bowman'schen Epithelien werden CK 7 und 19 exprimiert. Entsprechend der teilweise mesodermalen Herkunft wird Vimentin in viszeralem und parietalem Bowman'schen Epithelien koexprimiert (Gröne et al. 1987; Moll 1989; Moll et al. 1988; Moll, Hage, and Thoenes 1991; Ramaekers et al. 1985; Vilafranca, Wohlsein, and Trautwein 1994; Waldherr and Schwechheimer 1985).

Das **Übergangsepithel** besitzt ein komplexes Muster: Basispaare sind CK 8/18 sowie 7/19. Basal und intermediär können zusätzlich als Differenzierungsmarker die plattenepitheltypischen CK 4, 5, 13 und 17 exprimiert werden, während in den Deckzellen CK 4, 13 und 20 vorhanden sind (Achtstätter et al. 1985; Moll 1989; Moll 1993; Moll et al. 1988; Moll et al. 1982a).

Das metabolische Vitamin A-Derivat Retinsäure (Vitamin A₁-Säure) spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation der CK-Differenzierung: So kommt es infolge Vitamin A-Mangels zu einer Keratinisierung von Cornea-, Konjunktival-

oder Ösophagusepithel, wobei die Paare CK1/2 und 10, die normalerweise weder im Corneaepithel noch in unverhornten Epithelien vorkommen, exprimiert werden (Barthelmy, Chouvet, and Cambazard 1986; Fuchs et al. 1987). Auch zeigen Keratozyten in Zellkultur bei Zusatz von Retinsäure keine Verhornung (Yuspa and Harris 1974), während Keratozyten ohne Retinsäure vermehrt Verhornung zeigen (Eckert 1989; Fuchs and Green 1981). Dabei wird in einigen Zelllinien die Expression von CK 8, 18, 7 und 19 sowie CK 13 nach Zugabe von Retinsäure verstärkt (Glass and Fuchs 1988; Kim et al. 1987; Kopan, Traska, and Fuchs 1987), während die Expression der differenzierungspezifischen Zytokeratine 1, 10, 5, 14, 6 und 16 unterdrückt wird (Eckert and Green 1984; Fuchs and Green 1981; Tomic et al. 1990). Retinsäure beeinflusst die Differenzierung und Proliferation unterschiedlicher Zelltypen über eine Anbindung und Aktivierung spezifischer Kernrezeptoren. Die Transkription spezifischer Gene wird wahrscheinlich direkt kontrolliert durch die Bindung der Kernrezeptoren an ihre Liganden und an spezifische DNA-Erkennungselemente. Die Expression der Gene für CK 5, 6, 14 und 16 kann bereits 6 h nach Retinsäurebehandlung beobachtet werden (Stellmach, Leask, and Fuchs 1991; Tomic et al. 1990). Bisher konnte allerdings noch keine direkte Interaktion zwischen dem Rezeptor und spezifischen Keratinpromotoren nachgewiesen werden (Blumenberg, Connolly, and Freedberg 1992).

Das gewebetypische Zytokeratinmuster wird auch in den meisten Karzinomen beibehalten und kann so zur Identifikation von Karzinomen unbekannter Herkunft herangezogen werden; wobei in Karzinomen in der Regel keine „spezifische“ zusätzlichen Tumorzytokeratine exprimiert werden (Debus et al. 1984; Desnoyers, Haines, and Searcy 1990; Moll 1987; Moll et al. 1992; Quinlan et al. 1985; Ramaekers et al. 1983b; Ramaekers et al. 1983c).

Allerdings gibt es Hinweise auf ektopische Zytokeratinexpression in nichtepithelialen Geweben und Neoplasien (Franke, Jahn, and Knapp 1989): z.B. in Myokard und Myometrium (Huitfeldt and Brandtzaeg 1985), in malignen Melanomen (Miettinen and Franssila 1989), in extrafollikulären Retikulumzellen (Franke and Moll 1987) oder in der Muskulatur atherosklerotischer veränderter Gefäße (Jahn et al. 1993). Außerdem läßt sich mit der PCR mRNA des Zytokeratinpaares 8 und 18 in peripheren mononukleären Zellen, Knochenmarkszellen und im Lymphknoten nachweisen (Traweek, Liu, and Battifora 1993). Jedoch enthalten diese Zellen stets wesentlich größere Mengen ihres jeweils typischen Intermediärfilamentproteins, so daß in formalinfixierten und paraffineingebetteten Präparaten der Nachweis von Zytokeratin negativ ausfällt (Jahn et al. 1987; Kasper et al. 1988).

Letztendlich sind Zytokeratine auch zur Charakterisierung von Zellkulturen geeignet: Zum Beispiel zeigt die HeLa-Zelllinie die für Epithelien untypische CK-Paarung 7, 8, 17 und 18 (Quinlan et al. 1985).

Vimentin

In allen mesenchymalen (nichtmuskulären) Zellen, inklusive Makrophagen, Lymphozyten, Chondrozyten, Kupffer-Zellen, Melanozyten (Franke et al. 1978), Endothelien (Franke et al. 1979a), Linsenfasern (Ramaekers et al. 1980), Sertolizellen (Franke, Grund, and Schmid 1979), Leydigzellen (Miettinen, Virtanen, and Talerman 1985), Granulosazellen (Czernobilsky et al. 1985), Astrozyten, und Ependymzellen (Schnitzer, Franke, and Schachner 1981) sowie Gefäßmuskulatur (Altmannsberger et al. 1981; Gabbiani et al. 1981) ist Vimentin das Hauptintermediärfilament.

Vimentin gehört zum Subtyp III der Intermediärfilamentproteine mit einem MG von ca. 57.000 D (Lazarides 1982). In Zellkulturen exprimieren die meisten Zellen unabhängig von ihrer Herkunft nach einer gewissen Zeit Vimentin, zum Teil zusammen mit ihren eigentlichen IF (Franke et al. 1982a; Franke et al. 1979b; Lazarides 1982; Pieper et al. 1992; Si, Tsou, and Peacocke 1993). Die typische „Vimentinzelle“ ist der Fibroblast, wo Vimentin auch zuerst charakterisiert werden konnte (Brown, Levinson, and Spudich 1976).

Vimentin ist wahrscheinlich an intrazellulären Signalübertragungen beteiligt; es bindet an Zellplasma- und Zellkernmembranen (Georgatos and Blobel 1987; Wang 1985), ist an Mikrotubuli (Bloom, Luca, and Vallee 1985; Gyoeva and Gelfand 1991; Steinert and Roop 1988; Wang 1985), an Zentrosomen (Trevor, McGuire, and Leonova 1995) und an DNA und RNA (Kooijman et al. 1992) assoziiert, wobei Vimentinfilamente dicht von 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten umhüllt sein können (Traub et al. 1992). In Fettzellen werden die einzelnen Lipidtropfen von Vimentinfasern umhüllt (Franke, Hergt, and Grund 1987).

Zusätzlich ist Vimentin in vielen nichtmesenchymalen Zellen das Hauptintermediärfilament während der Embryogenese und Zellreifung und wird erst nach Abschluß der Entwicklung oder Differenzierung durch das zelltypische IF ersetzt (Bennett et al. 1978; Franke et al. 1982a; Lazarides 1981; Schnitzer, Franke, and Schachner 1981); dabei wird die Expression von Vimentin auf der Transkriptionsebene und nicht während der Translation reguliert (Bloemendal et al. 1985; Pieper et al. 1992; Steinert and Roop 1988). Zehner und Paterson (Zehner and Paterson 1985) konnten zeigen, daß das Vimentin-Gen als single Copy im haploiden Hühnergenom vorliegt und drei unterschiedliche mRNA Transkripte produziert.

Desmin

Lazarides und Hubbard (1976) konnten in glatten Muskelzellen einen schon länger bekannten intermediären Bestandteil des Zytoskeletts (Cooke 1976) näher charakterisieren, den sie Desmin nannten. Dieses Polypeptid ist das spezifische IF in glatter, in quergestreifter sowie in Herzmuskulatur und hat ein MG von etwa 53.000 D (Bennett et al. 1979; Lazarides 1980; Osborn and Weber 1982; Small and Sobieszek 1977; Steinert, Steven, and Roop 1985). In Purkinjefasern des Reizleitungssystems kann ein modifiziertes Desminfilament von 55.000 D dargestellt werden (Thornell et al. 1985). Desminfasern verbinden die Myofibrillen mit den Z-Streifen und binden diese sowohl an die Plasmamembran als auch andere zytoplasmatischen Organellen, wobei durchschnittlich etwa 10 Desminfasern an jedem Z-Streifen ansetzen (Lazarides 1980; Lazarides et al. 1982; Tokuyasu, Dutton, and Singer 1983). Senkrecht zur Längsachse der Muskelzellen formt Desmin ein Maschenwerk aus, wodurch die benachbarten Z-Streifen eine einheitliche Orientierung bekommen und letztendlich so die Querstreifung ermöglicht wird (Granger and Lazarides 1978; Lazarides and Hubbard 1976). Insgesamt scheint Desmin am Aufbau der mechanischen Stabilität von Myofibrillen beteiligt zu sein (Geiger 1987). Daneben konnte Desmin auch in extrafollikulären Retikulumzellen (Franke and Moll 1987) sowie in Mesothelzellen (Van Muijen, Ruiters, and Warnaar 1987) nachgewiesen werden. Da während der Myogenese Desmin bereits sehr früh und bei der Entdifferenzierung in Richtung Myoblast noch länger als Myoglobin exprimiert wird, ist Desmin ein sehr zuverlässiger Marker für Muskelgewebe und deren Neoplasien (Altmannsberger 1988; Altmannsberger et al. 1985b).

Gliafilamente (GFAP, glial fibrillary acidic protein)

GFAP wurde durch Eng et al. (1971) zuerst beschrieben, die es aus Plaques von Multiple Sklerose-Patienten isolieren konnten. Es ist das Strukturprotein bestimmter Gliazellen mit einem speziesabhängigen Molekulargewicht zwischen 49.000 und 55.000 D und ist in Zellen des Nervensystems wie fibrillären und protoplasmischen Astrozyten, ependymalen Tanyzytenfortsätzen sowie in Zellen der Glia limitans oft gemeinsam mit Vimentin nachweisbar (Bignami and Dahl 1974; Bignami et al. 1972; Debus, Weber, and Osborn 1983; Eng, Vanderhaeghen, and Gerstl 1971; Ramaekers et al. 1983c; Shaw, Osborn, and Weber 1981; Yen and Fields 1981). Darüber hinaus liegen Hinweise vor, daß GFAP unter anderem auch in Schwannzellen des peripheren Nervensystems (Achtstätter et al. 1986; Dahl et al. 1982; Yen and Fields 1981), in Satellitenzellen von Spinalgan-

glien, in Hypophysenzellen (Höfler, Denk, and Walter 1984) aber auch in perisinusoidalen Sternzellen der Leber (Gard, White, and Dutton 1985), in Linsenepithelien (Skoff et al. 1983), Chondrozyten (Viale et al. 1988) sowie in Darmwandganglien (Jessen and Mirsky 1980) vorkommen. Intrazellulär liegt GFAP sowohl diffus verteilt im Zytoplasma als auch assoziiert mit anderen Gliafilamenten vor: Offensichtlich wird in mindestens zwei voneinander unabhängigen Schritten zunächst GFAP synthetisiert, das diffus im Zytoplasma auftritt (Schachner et al. 1977) und zumindest in vitro spontan aggregieren kann (Rueger et al. 1979), sowie in weiteren genetisch determinierten Schritten zu Filamenten polymerisiert (Eng and DeArmond 1983). GFAP scheint evolutionär stark konserviert zu sein, so daß Antikörper gegen humanes GFAP bei vielen Spezies kreuzreagieren (Dahl and Bignami 1976).

Läsionen des ZNS (Traumata, chronische Erkrankungen etc.) führen zu einer Gliose und in den vermehrten und vergrößerten Astrozyten zu einer exzessiven Vermehrung von GFAP (Eng et al. 1985). Ähnliches kann in den retinalen Müller-Stützzellen beobachtet werden: Läsionen der Retina führen zu einer GFAP-Akkumulation in diesen spezifischen Gliazellen und ersetzen so das dort vorhandene Vimentin (Bignami and Dahl 1974; Davidson, Nassie, and Kornegay 1990).

Dementsprechend sind Astrogliome GFAP-positiv und Oligodendroglione und Ependymome GFAP-negativ (Obermaier 1991).

Neuronale Intermediärfilamente

In Neuronen wurden bisher 6 zum Teil unterschiedliche Intermediärfilamente nachgewiesen: Die Gruppe der insgesamt homologen *Neurofilamente* (NF), die entsprechend ihres Molekulargewichts in NF-L (light, 68.000 D), in NF-M (medium, 160.000 D) und NF-H (heavy, 200.000 D) unterteilt werden (Geisler, Plessmann, and Weber 1985), das *-Internexin* (Fliegner, Ching, and Liem 1990), das *Peripherin* (Portier, De Néchaud, and Gros 1983) und das *Nestin* (Lehdahl, Zimmermann, and McKay 1990).

Neurofilamente finden sich als sogenannte NF-Triplets mit einem Verhältnis von 6:2:1 (L:M:H) in den meisten myelinisierten Nervenfasern, in Ganglienzellen und in Neuronen inkl. Phäochromozyten (Debus et al. 1982; Debus, Weber, and Osborn 1983; Lee, H.L., and Schlaepfer 1982; Osborn et al. 1982; Portier 1992; Shaw, Osborn, and Weber 1981; Shaw and Weber 1981; Yen and Fields 1981), wobei die NF-L und NF-M integrale Filamentbestandteile sind, denen NF-H außen angelagert ist (Hirokawa, Glicksman, and Willard 1984). Neurofilamente spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Gestaltung und Erhaltung der Axonstrukturen (Hirokawa, Glicksman, and Willard 1984; Xu, Dong, and Cleve-

land 1994) und sind offensichtlich notwendig für das radiale Axonwachstum (Friede 1970; Hoffman et al. 1987).

Obwohl NF als neuronenspezifisch gelten, konnten NF-M und NF-L in unreifen Schwannzellen (Kelly et al. 1992; Roberson et al. 1992), NF-H in humanen T-Zellen (Murphy et al. 1993) und in embryonalem Herzgewebe von Ratten (Semb, Asano, and Kato 1990) nachgewiesen werden.

-Internexin ist gemeinsam mit NF-Untereinheiten in den meisten Neuronen von ZNS und PNS zu finden (Fliegner et al. 1994; Xu, Dong, and Cleveland 1994), wobei allerdings im PNS hauptsächlich NF zusammen mit Peripherin vertreten sind (Goldstein, House, and Gainer 1991; Xu, Dong, and Cleveland 1994).

Peripherin (MG 58.000 D) wird vor allem in peripheren Neuronen nachgewiesen und den Typ III Intermediärfilamenten zugeordnet (Goldstein, House, and Gainer 1991; Portier, De Néchaud, and Gros 1983).

Nestin (MG 200.000) konnte bislang nur in neuroepithelialen Stammzellen nachgewiesen werden (Lehndahl, Zimmermann, and McKay 1990).

Lamine

Diese IF spielen bislang in der Typisierung von neoplastischen Geweben nur eine nachgeordnete Rolle.

Lamine sind die Hauptstrukturproteine des Karyoskeletts. Sie bilden den sogenannten Kernlaminakomplex an der inneren Kernmembran (Aebi et al. 1988; Bridger, Kill, and Hutchinson 1993; Franke 1987; Katsuma et al. 1987), der aus einer filamentösen Lage von bis zu drei unterschiedlichen Polypeptiden (Lamin A, B und C) aufgebaut ist. Lamin C ist die spliced Variante von Lamin A (Georgatos, Meier, and Simos 1994; Lin and Worman 1993). Sequenzdaten basierend auf cDNA der Lamine zeigen die große Ähnlichkeit zu den zytoplasmatischen IF (Lin and Worman 1993). Die Zentraldomäne der Lamine zeigt eine etwa 28%ige Aminosäurehomologie mit Vimentin (Aebi et al. 1988).

Neben Beteiligung an der Kernform, bilden die Lamine ein Netzwerk für die Organisation des Interphase-Chromatins und sind Substrat für Proteinkinasen während der Mitose und in der Interphase (Bridger, Kill, and Hutchinson 1993; Franke 1987; Glass et al. 1993; Hennekes et al. 1993).

Koexpression von IF

Verschiedene Gewebe exprimieren bereits per se unterschiedliche IF in verschiedenen ausgeprägten Umfang, wobei es sich meistens um echte, intrazellulär getren-

nte Filamentkompartimente handelt (Franke et al. 1978; Franke et al. 1982b).

Zytokeratin und Vimentin

Im Laufe der Embryonalentwicklung wird speziell im Mesoderm das bereits früh exprimierte Vimentin durch Zytokeratine ersetzt und dadurch noch für einige Zeit postnatal koexprimiert (Franke et al. 1982a). Werden Epithelien in Zellkultur überführt, beginnen sie schon bald zusätzlich Vimentin zu exprimieren (Franke et al. 1979b; Kim et al. 1987; Lazarides 1982; Pieper et al. 1992; Si, Tsou, and Peacocke 1993). Ähnliches kann bei Tumorzellen in pleuraler und abdominalen Transsudaten beobachtet werden (Ramaekers et al. 1983a). Allgemein kann in Epithelien bei Zellschädigungen (Gröne et al. 1987; Moll, Hage, and Thoenes 1991; Van Muijen, Ruiters, and Warnaar 1987), aber auch bei gesteigerter Proliferationsrate (Domagala et al. 1990; Raymon and Leong 1989), Vimentin nachgewiesen werden.

Zytokeratine können zusammen mit Vimentin z.B. in fetalen Nieren- und Zungenepithelien (Van Muijen, Ruiters, and Warnaar 1987), bei Nephropathien im Tubulusepithel (Vilafranca, Domingo, and Ferrer 1994), in Nierenzellkarzinomen (Herman et al. 1983), in Epithelien des Rete testis und Epididymis (Dinges et al. 1991), in Prostatae (Nagle et al. 1991), in Endometriumsdrüsen (Azumi and Battifora 1987) sowie deren Karzinomen (McNutt et al. 1985), in Granulosazellen und Rete ovarii humaner Ovarien sowie Ovarialkarzinomen (Czernobilsky et al. 1985; Dabbs, Geisinger, and Norris 1986), in Plattenepithelkarzinomen und undifferenzierten Karzinomen des oberen Verdauungstraktes (Fischer et al. 1988), in den intestinalen M-Zellen (Jepson et al. 1992), in Speicheldrüsenneoplasien (Caselitz et al. 1984), in Chordomen (Miettinen et al. 1983), im Follikel-epithel der Schilddrüse und Schilddrüsenkarzinomen (Buley et al. 1987) gefunden werden. In Mesothelzellen und in Mesotheliomen finden sich regelmäßig Zytokeratine (CK 5, 7, 8, 18, 19) und Vimentin (Blobel et al. 1985; Connell and Rheinwald 1983; Czernobilsky et al. 1985; LaRocca and Rheinwald 1984; Van Muijen, Ruiters, and Warnaar 1987), wobei zusätzlich auch vereinzelt Desmin nachgewiesen werden kann (Mayall, Goddard, and Bibbs 1992; Van Muijen, Ruiters, and Warnaar 1987). Auch in einigen Lungenkarzinomen (Gatter et al. 1986) und vereinzelt in malignen Tumoren unterschiedlicher Herkunft (Düe, Pickartz, and Stein 1986) wurde eine mehrfache Koexpression von Vimentin, Neurofilament und Desmin nachgewiesen. Während die Koexpression von Vimentin mit anderen Typ-III- (Desmin, GFAP, Peripherin) oder Typ-IV-Intermediärfilamenten (Neurofilamente) meist zur Ausbildung eines „Kopolymers“ führen, werden bei Koexpression von Zytokeratinen und Vimentin getrennte Netzwerke ausgebildet (Lazarides 1982; Steinert and Roop 1988; Traub, Kuhn, and Grub 1993).

Zytokeratin und GFAP

In Myoepithelien der Gld. parotis können neben Zytokeratinen auch GFAP gefunden werden (Achtstätter et al. 1986; Gould 1985), was andere Untersucher allerdings nicht bestätigen können (Burns, Dardick, and Parks 1988). Über ektopisches Auftauchen von GFAP in Karzinomen des Mesoderms - wie Ovarial- und Endometriumskarzinomen - wird vereinzelt berichtet (Moll et al. 1991), wobei in diesen Fällen oftmals S-100-Protein zusätzlich exprimiert wird (Moll et al. 1991).

In exzidierten epiretinalen Membranen kann GFAP zusammen mit Zytokeratin nachgewiesen werden (Vinores et al. 1992).

Einige Autoren (Cosgrove et al. 1989; Ng and Lo 1989) berichten, daß GFAP zusammen mit Zytokeratin in normalen und neoplastischen Astrozyten zu finden sei. Allerdings postulieren Bacchi et al. (1995), daß dies nur „Immunreaktivitäten“ seien, die unter bestimmten Laborbedingungen auftauchen, da trotz immunhistochemisch eindeutigen Befunden, im Western Blot kein Zytokeratin nachgewiesen werden kann. In einer großen angelegten Studie an Gefriermaterial konnten Franke et al. (1991) zeigen, daß einige Zytokeratinantikörper mit GFAP kreuzreagieren und das weiterhin unspezifische Bindungen des Brückenantikörpers an das Gewebe ebenso wie technische Probleme (kontaminierende Bestandteile in der Antikörperkörperpräparation, besonders bei Aszites-Präparationen) für diese Kreuzreaktionen verantwortlich sind.

Zytokeratin und Neurofilament

Zytokeratine können zusammen mit Neurofilamenten in epithelialen neuroendokrinen Neoplasien der Nebenniere, der Hypophyse, der Langerhansinseln, der Epithelkörperchen, der Schilddrüse aber auch in Merkelzelltumoren der Haut nachgewiesen werden (Kasper 1992; Miettinen et al. 1985; Miettinen, Clark, and Virtanen 1986; Miettinen et al. 1983; Moll et al. 1986; Ogawa et al. 1990).

Vimentin und GFAP

Die Koexpression dieser beiden Intermediärfilamente kann vor allem in Astrozyten des ZNS (Zerebellum, Retina, Nervus opticus), in reaktiven Astrozyten (Calvo, Carbonell, and Boya 1990; Schiffer et al. 1986; Schnitzer, Franke, and Schachner 1981; Shaw, Osborn, and Weber 1981) und in Astrozytomen beobachtet werden (Herpers et al. 1986).

Verlust bzw. Fehlen und Neoexpression von IF

Nur vereinzelt Zellen fehlen jegliche Intermediärfilamente: der Granularzellschicht im Kleinhirn, Oligodendrozyten (Shaw, Osborn, and Weber 1981; Shaw and Weber 1981), Keimzellen oder Zellen in der frühen Embryonalphase (Jackson et al. 1980; Jackson et al. 1981).

Obwohl das Differenzierungsprogramm der Zellen auch in malignen Transformationen weitgehend erhalten bleibt, sind beim Menschen vereinzelte Expressionsverluste beschrieben worden: Zum Beispiel Verlust von CK 4 und 13 in Karzinomen des Oropharynx, Verlust von CK 13 bei Urothelkarzinomen oder kompletter Verlust von Intermediärfilamenten beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Lobeck et al. 1986; Moll, Hage, and Thoenes 1991). Häufiger ist allerdings das Gegenteil der Fall: Neoexpression von Intermediärfilamenten, die in unveränderten Geweben nicht auftreten (Holck et al. 1993). Vor kurzem wurde darauf hingewiesen, daß die Malignität bestimmter Neoplasien mit dem Auftauchen bestimmter Zytokeratine korreliert: Die Expression von einfachen Zytokeratinen scheint zu verstärkter Zellbewegung und zu Gefäßeinbrüchen zu führen (Chu et al. 1993), außerdem scheint die Bildung maligner Zellen forciert zu werden (Caulin et al. 1992); so scheint die Expression von CK 8 direkt mit der Malignität zu korrelieren (Hembrough et al. 1996). Denkbar ist auch, daß das Anschalten bestimmter Onkogene zu einer Aktivierung der Zytokeratinexpression führt (Pankov et al. 1994).

Literatur Zytoskelett

- Achtstätter, T., R. Moll, A. Anderson, C. Kuhn, S. Pitz, K. Schwechheimer, and W.W. Franke. 1986. Expression of glial filament protein (GFP) in nerve sheaths and non-neural cells re-examined using monoclonal antibodies. With special emphasis on the co-expression of GFP and cytokeratins in epithelial cells of human salivary gland and pleomorphic adenomas. *Differentiation* 31:206 - 227.
- Achtstätter, T., R. Moll, B. Moore, and W.W. Franke. 1985. Cytokeratin patterns of different epithelia of the human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33:415 - 426.
- Aebi, U., W.E. Fowler, P. Rew, and T.T. Sun. 1983. The fibrillar substructure of keratin filaments unraveled. *Journal of Cell Biology* 97:1131 - 1143.
- Aebi, U., M. Häner, J. Troncoso, R. Eichner, and A. Engel. 1988. Unifying principles in intermediate filament (IF) structure and assembly. *Protoplasma* 145:73 - 81.

- Altmannsberger, M. 1988. *Intermediärfilamentproteine als Marker in der Tumordiagnostik*. Edited by G. Seifert. Vol. 127, *Veröffentlichungen aus der Pathologie (Progress in Pathology)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Altmannsberger, M., T. Dirk, M. Droese, K. Weber, and M. Osborn. 1986. Keratin polypeptide distribution in benign and malignant breast tumors: subdivision of ductal carcinomas using monoclonal antibodies. *Virchows Archiv B, Cell Pathology* 51:265 - 275.
- Altmannsberger, M., M. Osborn, M. Droese, K. Weber, and A. Schauer. 1984. Diagnostic value of intermediate filament antibodies in clinical cytology. *Klinische Wochenschrift* 62:114 - 123.
- Altmannsberger, M., M. Osborn, E. Heise, T. Dirk, M. Droese, and K. Weber. 1985a. Cytokeratine in Mammacarcinomen. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 69:204 - 206.
- Altmannsberger, M., M. Osborn, A. Schauer, and K. Weber. 1981. Antibodies to different intermediate filament proteins: cell type-specific markers on paraffin-embedded human tissues. *Laboratory Investigation* 45:427 - 43.
- Altmannsberger, M., K. Weber, R. Droste, and M. Osborn. 1985b. Desmin is a specific marker for rhabdomyosarcomas of human and rat origin. *American Journal of Pathology* 118:85 - 95.
- Amos, L.A. 1985. Structure of muscle filaments studied by electron microscopy. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 14:291-313.
- Amos, L.A., and T.S. Baker. 1979. The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature* 279:607-612.
- Arai, K., S. Kaneko, M. Naoi, M. Suzuki, K. Maruo, and K. Uehara. 1994. Expression of stratified squamous epithelia-type cytokeratin by canine mammary epithelial cells during tumorigenesis: Type I (acidic) 57 kilodalton cytokeratin could be a molecular marker for malignant transformation of mammary epithelial cells. *Journal of Veterinary Medicine Science* 56:51 - 58.
- Azumi, N., and H. Battifora. 1987. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology* 88:286 - 296.
- Bacchi, C.E., R.J. Zarbo, J.J. Jiang, and A.M. Gown. 1995. Do glioma express cytokeratin? *Applied Immunohistochemistry* 3:45-53.
- Baden, H.P., L.A. Glodsmith, and B. Fleming. 1973. The polypeptide composition of epidermal prekeratin. *Biochimica et Biophysica Acta* 317:303 - 311.
- Bader, B.L., T.M. Magin, M. Hatzfeld, and W.W. Franke. 1986. Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19 an exceptional tail-less intermediate filament protein. *European Molecular Biology Organization Journal* 5:1865-1875.
- Balaton, A.J., M. Nehama-Sibony, C. Gotheil, P. Callard, and E.E. Baviera. 1988. Distinction between hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic carcinoma based on immunohistochemical staining for carcinoembryonic antigen and for cytokeratin 19 on paraffin sections. *Journal of Pathology* 156:305-310.

- Bandman, E. 1985. Myosin isoenzyme transitions in muscle development maturation and disease. *International Review of Cytology* 97:97 - 131.
- Barthelmy, H., B. Chouvet, and F. Cambazard. 1986. Skin and mucosal manifestations in vitamin deficiency. *Journal of the American Academy of Dermatology* 15:1263 - 1274.
- Bauer, C., and P. Traub. 1995. Interaction of intermediate filaments with ribosomes in vitro. *European Journal of Cell Biology* 68:288-296.
- Bennett, G.S., S.A. Fellini, J.M. Croop, J.J. Otto, J. Bryan, and H. Holtzer. 1978. Differences among 100 Å filament subunits from different cell types. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:4364 - 4368.
- Bennett, G.S., S.A. Fellini, Y. Toyama, and H. Holtzer. 1979. Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *Journal of Cell Biology* 82:577 - 584.
- Biberfeld, D., J.-L.E. Ericsson, P. Perlman, and M. Raftell. 1965. Increased occurrence of cytoplasmic filaments in vitro propagated rat liver epithelial cells. *Experimental Cell Research* 39:301 - 305.
- Bignami, A., and D. Dahl. 1974. Astrocyte-specific proteins and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *Journal of Comparative Neurology* 153:27 - 38.
- Bignami, A., L.F. Eng, D. Dahl, and C.T. Ugeda. 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Research* 43:429 - 435.
- Blobel, G.A., R. Moll, W.W. Franke, K.W. Kayser, and V.E. Gould. 1985. The intermediate filament cytoskeleton of malignant mesotheliomas and its diagnostic significance. *American Journal of Pathology* 121:235 - 247.
- Blobel, G.A., R. Moll, W.W. Franke, and I. Vogt-Moykopf. 1984. Cytokeratins in normal lung and lung carcinomas. *Virchows Archiv B, Cell Pathology* 45:407 - 429.
- Bloemendal, H., W. Quax, Y. Quax-Jeuken, R. Van den Heuvel, W.V. Egberts, and L. Van den Broek. 1985. Vimentin and Desmin cDNA clones: structural aspects of corresponding proteins and genes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:95 - 105.
- Bloom, G.S., F.C. Luca, and R.B. Vallee. 1985. Cross-linking of intermediate filaments to microtubules by microtubule-associated protein 2. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:18 - 31.
- Blumenberg, M., D.M. Connolly, and I.M. Freedberg. 1992. Regulation of keratin gene expression: The role of the nuclear receptors for retinoid acid, thyroid hormone, and vitamin D3. *Journal of Investigative Dermatology* 98:42S - 49S.
- Bowden, P.E., H.J. Stark, D. Breitreutz, and N.E. Fusenig. 1987. Expression and modification of keratins during terminal differentiation of mammalian epidermis. *Current Topics in Developmental Biology* 22:35-68.
- Bridger, J.M., I.R. Kill, and C.J. Hutchinson. 1993. Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *Journal of Cell Science* 104:297 - 306.

- Brinkley, B.R. 1985. Microtubule organizing centers. *Annual Review of Cell Biology* 1:145 - 172.
- Broers, J.L.V., L. De Leij, M. Klein Rot, A. Ter Haar, E.B. Lane, I.M. Leigh, S.S. Wagenaar, G.P. Vooijs, and C.S. Ramaekers. 1989. Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human lung tissues. *Differentiation* 40:119 - 128.
- Brown, S., W. Levinson, and J.A. Spudich. 1976. Cytoskeletal elements of the chick embryo fibroblasts revealed by detergent extraction. *Journal of Supramolecular Structure* 5:119-130.
- Buley, J.D., K.C. Gatter, A. Hervet, and D.Y. Mason. 1987. Expression of intermediate filament proteins in normal and diseased thyroid glands. *Journal of Clinical Pathology* 40:136-142.
- Bulletin, E.S.A., D.J. Derosier, L.M. Coluccio, and L.G. Tilney. 1988. Three-dimensional reconstruction of an actin bundle. *Journal of Cell Biology* 107:597-611.
- Burns, B.F., I. Dardick, and W.R. Parks. 1988. Intermediate filament expression in normal parotid glands and pleomorphic adenomas. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology* 413:103 - 112.
- Calvo, J.L., A.L. Carbonell, and J. Boya. 1990. Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve. *Brain Research* 532:355-357.
- Carrier, M.-F., and D. Pantaloni. 1994. Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin β 4 and profilin. *Seminars in Cell Biology* 5:183-191.
- Cary, R.B., and M.W. Klymkowsky. 1994a. Desmin organization during the differentiation of the dorsal myotome in *Xenopus laevis*. *Differentiation* 56:31 - 38.
- Cary, R.B., and M.W. Klymkowsky. 1994b. Differential organization of desmin and vimentin in muscle is due to differences in their head domains. *Journal of Cell Biology* 126:445 - 456.
- Caselitz, J., J. Becker, G. Seifert, K. Weber, and M. Osborn. 1984. Coexpression of keratin and vimentin filaments in adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 403:337 - 344.
- Caulin, C., C. Bauluz, A. Gandarillas, A. Cano, and M. Quintanilla. 1992. Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes. *Experimental Cell Research* 204:11 - 21.
- Celis, Julio E., Hanne Holm Rasmussen, Eydfinnur Olsen, Peder Madsen, Henrik Leffers, Bent Honoré, Kurt Dejgaard, Paul Gromov, Henrik Vorum, Alex Vassilev, Yasemin Baskin, Xiangdang Liu, Ariana Celis, Bodil Basse, Jette B. Lauridsen, Gitte P. Ratz, Annette H. Andersen, Else Walbum, Inge Kjærgaard, Inger Andersen, Magda Puype, Josef Van Damme, and Joel Vandekerckhove. 1994. The human keratinocyte two-dimensional protein database (update 1994): Towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases. *Electrophoresis* 15:1349-1458.

- Chu, Y.-W., R.B. Runyan, R.G. Oshima, and M.J.C. Hendrix. 1993. Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:4261 - 4265.
- Collin, C., R. Moll, S. Kubicka, J.-P. Ouhayoun, and W.W. Franke. 1992. Characterization of human cytokeratin 2. An epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation. *Experimental Cell Research* 202:132-141.
- Connell, N.D., and J.G. Rheinwald. 1983. Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase of vimentin during rapid growth in culture. *Cell* 34:245-253.
- Conway, J.F., and D.A.D Parry. 1988. Intermediate filament structure: 3. Analysis of sequence homology. *International Journal of Biological Macromolecules* 10:79 - 98.
- Cooke, P. 1976. A filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibers. *Journal of Cell Biology* 68:539 - 556.
- Cooper, D.A., A. Schermer, and T.-T. Sun. 1985. Biology of disease. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Laboratory Investigation* 52:243 - 256.
- Cosgrove, M., P.L. Fitzgibbons, A. Sherrod, P.T. Chandasoma, and S.E. Martin. 1989. Intermediate filament expression in astrocytic neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology* 13:141-145.
- Crick, F.H.C. 1953. The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallographica* 6:689 - 697.
- Czernobilsky, B., R. Moll, R. Levy, and W.W. Franke. 1985. Coexpression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *European Journal of Cell Biology* 37:175-190.
- Dabbs, D.J., K.R. Geisinger, and H.T. Norris. 1986. Intermediate filaments in endometrial and endocervical carcinomas: the diagnostic utility of vimentin patterns. *American Journal of Surgical Pathology* 10:568-576.
- Dahl, D., and A. Bignami. 1976. Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Research* 61:279-293.
- Dahl, D., N.H. Chi, L.E. Miles, B.T. Nguyen, and A. Bignami. 1982. Glial fibrillary acidic (GFA) protein in schwann cells: fact or artifact. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 9:912 - 918.
- Davidson, M., M. Nassie, and J. Kornegay. 1990. Intermediate filament complement of the normal and gliotic canine retina. *Journal of Comparative Pathology* 103:125 - 134.
- Debus, E., G. Fl, K., K. Weber, and M. Osborn. 1982. A monoclonal antibody specific for the 200 k polypeptide of the neurofilament triplet. *EMBO J.* 1:41 - 45.
- Debus, E., R. Moll, W.W. Franke, K. Weber, and M. Osborn. 1984. Immunohistochemical distribution of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *American Journal of Pathology* 114:121 - 130.

- Debus, E., K. Weber, and M. Osborn. 1983. Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation* 25:193 - 203.
- Denk, H., and E. Lackinger. 1986. Cytoskeleton in liver diseases. *Seminars in Liver Disease* 6:199 - 211.
- Desnoyers, MM, DM Haines, and GP Searcy. 1990. Immunohistochemical detection of intermediate filament proteins in formalin fixed normal neoplastic canine tissues. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 54:360-365.
- Dinges, H.P., K. Zatloukal, C. Schmid, S. Mair, and G. Wirnsberger. 1991. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in rete testis and epididymis. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 418:199-127.
- Domagala, W., J. Lasota, J. Bartkowiak, K. Weber, and M. Osborn. 1990. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinoma with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *American Journal of Pathology* 136:219-227.
- Downing, D.T. 1995. Molecular modeling indicates that homodimers form the basis for intermediate filament assembly from human and mouse epidermal keratins. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 23:204-217.
- Düe, W., H. Pickartz, and H. Stein. 1986. Koexpression von Zytokeratin, Desmin und Neurofilament in malignen Tumoren. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 72:233 - 236.
- Eckert, R.L. 1989. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiological Reviews* 69:1316 - 1346.
- Eckert, R.L., and H. Green. 1984. Cloning of cDNAs specifying vitamin A-responsive keratins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:4321 - 4325.
- Eichner, R., P. Bonitz, and T.-T. Sun. 1984. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity isoelectric point and the mode of expression. *Journal of Cell Biology* 98:1388-1396.
- Elliot, A., G. Offer, and K. Burridge. 1976. Electron microscopy of myosin molecules from muscle and nonmuscle sources. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 193:45 - 53.
- Eng, L.F., and S.J. DeArmond. 1983. Immunocytochemistry of the glial fibrillary acidic protein. *Progress in Neuropathology* 5:19-39.
- Eng, L.F., M.E. Smith, J. De Vellis, and R.P. Skoff. 1985. Recent studies of the glial fibrillary acidic protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:525-537.
- Eng, L.F., J.J. Vanderhaeghen, and B. Gerstl. 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 28:351 - 354.
- Eyken, Peter van, and Valeer J. Desmet. 1993. Cytokeratins and the liver. *Liver* 13:113-122.

- Eyken, Peter van, R. Sciot, Boudewijn van Damme, Chris de Wolf-Peeters, and V.J. Desmet. 1987. Keratin immunohistochemistry in normal human liver. Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts, and acinar gradient. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 412:63 - 72.
- Eyken, Peter van, R. Sciot, A. Paterson, F. Callea, M.C. Kew, and V.J. Desmet. 1988. Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Human Pathology* 19:562 - 568.
- Fischer, H.P., M. Altmannsberger, K. Weber, and M. Osborn. 1987. Keratin polypeptides in malignant epithelial liver tumors. Differential diagnostic and histogenetic aspects. *American Journal of Pathology* 127:530-537.
- Fischer, H.P., F. Wallner, H. Maier, and M. Altmannsberger. 1988. Koexpression von Keratin und Vimentin in Plattenepithelkarzinomen als Zeichen einer pseudosarkomatösen Differenzierung. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 72:237 - 240.
- Fliegner, K.H., G.Y. Ching, and R.K.H. Liem. 1990. The predicted amino acid sequence of α -internexin is that of a novel neuronal intermediate filament protein. *European Molecular Biology Organization Journal* 9:749 - 755.
- Fliegner, K.H., M.P. Kaplan, T.L. Wood, J.E. Pintar, and R.K.H. Liem. 1994. Expression of the gene for the neuronal intermediate filament α -internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 342:161 - 173.
- Franke, F.E., W. Schachenmayr, M. Osborn, and M. Altmannsberger. 1991. Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *American Journal of Pathology* 139:67 - 79.
- Franke, W.W. 1987. Nuclear laminins and cytoplasmatic intermediate filament proteins: A growing multigene family. *Cell* 48:3 - 4.
- Franke, W.W., C. Grund, C. Kuhn, B.W. Jackson, and K. Illmensee. 1982a. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis: III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* 23:43 - 59.
- Franke, W.W., C. Grund, and E. Schmid. 1979. Intermediate-sized filaments present in sertoli cells are of vimentin-type. *European Journal of Cell Biology* 19:269 - 275.
- Franke, W.W., M. Hergt, and C. Grund. 1987. Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* 49:131 - 141.
- Franke, W.W., L. Jahn, and A.C. Knapp. 1989. Cytokeratins and desmosomal proteins in certain epitheloid and non-epithelial cells. In *Cytoskeletal proteins in tumor diagnosis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Franke, W.W., and R. Moll. 1987. Cytoskeletal components of lymphoid organs. I. Synthesis of cytokeratins 8 und 18 and desmin in subpopulations of extrafollicular reticulum cells of human lymph nodes tonsils and spleen. *Differentiation* 36:145 - 163.

- Franke, W.W., D.L. Schiller, R. Moll, S. Winter, E. Schmid, and I. Engelbrecht. 1981. Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *Journal of Molecular Biology* 153:933-959.
- Franke, W.W., E. Schmid, M. Osborn, and K. Weber. 1978. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:5034 - 5038.
- Franke, W.W., E. Schmid, M. Osborn, and K. Weber. 1979a. Intermediate sized filaments of human endothelial cells. *Journal of Cell Biology* 81:570 - 580.
- Franke, W.W., E. Schmid, D.L. Schiller, S. Winter, E.D. Jarasch, R. Moll, H. Denk, B.W. Jackson, and K. Illmensee. 1982b. Differentiation-related patterns of expression of intermediate-sized filaments in tissues and cultured cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 46:431-453.
- Franke, W.W., E. Schmid, S. Winter, M. Osborn, and K. Weber. 1979b. Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin type in cultured cells from diverse vertebrates. *Experimental Cell Research* 123:25 - 46.
- Friede, R. 1970. Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve. *Anatomic Record* 167:379 - 388.
- Fuchs, E. 1988. Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. *Trends in Genetics* 4:277 - 281.
- Fuchs, E., and H. Green. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19:1033 - 1042.
- Fuchs, E., and H. Green. 1981. Regulation of the terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 25:617 - 625.
- Fuchs, E., I. Hanukoglu, D. Marchuk, M.P. Grace, and K.H. Kim. 1985. The nature and significance of differential keratin gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:436 - 450.
- Fuchs, E., A.L. Tyner, G.J. Giudice, D. Marchuk, A.R. Chaudhury, and Rosenberg. M. 1987. The human keratin genes and their differential expression. *Current Topics in Developmental Biology* 22:5 - 34.
- Fuchs, E., and K. Weber. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annual Review of Biochemistry* 63:345 - 482.
- Fuchs, E. V., S.M. Coppock, H. Green, and D.W. Cleveland. 1981. Two distinct classes of epidermal keratin genes and their evolutionary significance. *Cell* 27:75 - 84.
- Gabbiani, G., Y. Kapanci, and W. Franke. 1981. Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. *American Journal of Pathology* 104:206 - 216.
- Gabbiani, G., E. Schmid, S. Winter, C. Chaponnier, De Chastonay C., J. Vandekerckhove, K. Weber, and W.W. Franke. 1981. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific α -type actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:298 - 302.

- Gard, A.L., F.P. White, and G.R. Dutton. 1985. Extra-neuronal glial fibrillary acid protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *Journal of Neuroimmunology* 8:359-385.
- Gatter, K.C., M.S. Dunnill, G.N.P. Van Muijen, and D.Y. Mason. 1986. Human lung tumours may coexpress different classes of intermediate filaments. *Journal of Clinical Pathology* 39:950 - 954.
- Geiger, B. 1987. Intermediate filaments: looking for a function. *Nature* 329:392-393.
- Geisler, N., T. Heimburg, J. Schunemann, and K. Weber. 1993. Peptides from the conserved ends of the rod domain of desmin disassemble intermediate filaments and reveal unexpected structural features: a circular dichroism, Fourier transform infrared, and electron microscopic study. *Journal of Structural Biology* 110:205 - 214.
- Geisler, N., E. Kaufmann, and K. Weber. 1982. Proteinchemical characterization of three structurally distinct domains along the protofilament unit of desmin 10 nm filaments. *Cell* 30:277 - 286.
- Geisler, N., E. Kaufmann, and K. Weber. 1985. Antiparallel orientation of the two double-stranded coiled-coils in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments. *Journal of Molecular Biology* 182:173 - 177.
- Geisler, N., U. Plessmann, and K. Weber. 1985. The complete amino acid sequence of the major mammalian neurofilament protein (NF-L). *FEBS Letters* 182:475 - 478.
- Geisler, N., J. Schünemann, and K. Weber. 1992. Chemical cross-linking indicates a staggered and antiparallel protofilament of desmin intermediate filaments and characterizes one higher-level complex between protofilaments. *European Journal of Biochemistry* 206:841 - 852.
- Geisler, N., and K. Weber. 1981. Comparison of the proteins of two immunologically distinct intermediate-sized filaments by amino acid sequence analysis: desmin and vimentin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:4120 - 41123.
- Geisler, N., and K. Weber. 1982. The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. *European Molecular Biology Organization Journal* 1:1649 - 1656.
- Geisler, N., and K. Weber. 1986. Structural aspects of intermediate filaments. In *Cell and molecular biology of the cytoskeleton.*, edited by J. W. Shay: Plenum Publ. Corp.
- Georgatos, S.D., and G. Blobel. 1987. Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. *Journal of Cell Biology* 105:117 - 127.
- Georgatos, S.D., J. Meier, and G. Simos. 1994. Lamins and lamin-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 6:347 - 353.
- Gibbons, I.R. 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *Journal of Cell Biology* 91:107s - 124s.

- Glass, C., and E. Fuchs. 1988. Isolation, sequence, and differential expression of a human K7 gene in simple epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 107:1337 - 1350.
- Glass, C.A., J.R. Glass, H. Taniura, K.W. Hasel, J.M. Blevitt, and L. Gerace. 1993. The α -helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *European Molecular Biology Organization Journal* 12:4413 - 4424.
- Goldstein, M.E., S.B. House, and H. Gainer. 1991. NF-L and peripherin immunoreactivity define distinct classes of rat sensory ganglion cells. *Journal of Neuroscience Research* 30:92 - 104.
- Gorbsky, G.J., P.J. Sammak, and G.G. Borisy. 1988. Microtubule dynamics and chromosome motion visualized in living anaphase cells. *Journal of Cell Biology* 106:1185 - 1192.
- Gould, V.E. 1985. The coexpression of distinct classes of intermediate filaments in human neoplasms. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 109:984 - 985.
- Gown, A.M., and A.M. Vogel. 1984. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissue. *American Journal of Pathology* 114:309 - 321.
- Gown, A.M., and A.M. Vogel. 1985. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. III. Analysis of tumors. *American Journal of Clinical Pathology* 84:413 - 424.
- Granger, B.L., and E. Lazarides. 1978. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell* 15:1253-1268.
- Gröne, H.-J., K. Weber, E. Gröne, U. Helmchen, and M. Osborn. 1987. Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. *American Journal of Pathology* 129:1 - 8.
- Gyoeva, F.K., and V.I. Gelfand. 1991. Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature* 353:445 - 448.
- Hanukoglu, I., and E. Fuchs. 1983. The cDNA sequence of a type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins. *Cell* 33:915 - 924.
- Hatzfeld, M., and W.W. Franke. 1985. Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *Journal of Cell Biology* 101:1826 - 1841.
- Heid, H.W., I. Moll, and W.W. Franke. 1988a. Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation* 37:137-157.
- Heid, H.W., I. Moll, and W.W. Franke. 1988b. Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum). *Differentiation* 37:215-230.

- Heid, H.W., E. Werner, and W.W. Franke. 1986. The complement of native α -keratin polypeptides of hair-forming cells: a subset of eight polypeptides that differ from epithelial cytokeratins. *Differentiation* 32:101-119.
- Heins, S., P.C. Wong, S. Müller, K. Goldie, and D.W. Cleveland. 1993. The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. *Journal of Cell Biology* 123:1517 - 1533.
- Hembrough, Todd A., Kristen R. Kralovich, Li Li, and Steven L. Gonias. 1996. Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells in vitro binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation. *Biochemical Journal* 317:763-769.
- Hennekes, H., M. Peter, K. Weber, and E.A. Nigg. 1993. Phosphorylation by protein kinase C sites inhibits nuclear import of lamin B2. *Journal of Cell Biology* 120:1293 - 1304.
- Herman, C.J., O. Moesker, A. Kant, A. Huysmans, G.P. Vooijs, and F.C.S. Ramaekers. 1983. Is renal cell (Grawitz) tumor a carcinosarcoma? *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 44:73 - 83.
- Herpers, M.J.H.M., F.C.S. Ramaekers, J. Aldeweireldt, O. Moesker, and J. Sloof. 1986. Co-expression of glial fibrillary acid protein and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathologica (Berlin)* 70:333-339.
- Hirokawa, N., M.A. Glicksman, and M.B. Willard. 1984. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within neuronal cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 98:1523 - 1536.
- Hoffman, P.N., D.W. Cleveland, J.W. Griffin, P.W. Landes, N.J. Cowan, and D.L. Price. 1987. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:3472 - 3476.
- Höfler, H., H. Denk, and G.F. Walter. 1984. Immunohistochemical demonstration of cytokeratins in endocrine cells of the human pituitary gland and in pituitary adenomas. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 404:359 - 368.
- Holck, S., L. Pedersen, T. Schiodt, K. Zedeler, H. Mouridsen, and T. Schidt. 1993. Vimentin expression in 98 breast cancers with medullary features and its prognostic significance. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 422:475 - 479.
- Huitfeldt, H.S., and P. Brandtzaeg. 1985. Various keratin antibodies produce immunohistochemical staining of human myocardium and myometrium. *Histochemistry* 83:381-389.
- Huxley, E.H. 1971. The structural basis of muscle contraction. *Proc. Roy. Soc. London (B)* 178:131 - 149.
- Hynes, R., and A. Destree. 1978. 10 nm filaments in normal and transformed cells. *Cell* 13:151 - 163.

- Ishikawa, H., R. Bischoff, and H. Holtzer. 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 38:538-555.
- Ishikawa, H., R. Bischoff, and H. Holtzer. 1969. Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *Journal of Cell Biology* 43:312-328.
- Jackson, B.W., C. Grund, E. Schmid, K. Bärki, W.W. Franke, and K. Illmensee. 1980. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. I. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17:161 - 179.
- Jackson, B.W., C. Grund, S. Winter, W.W. Franke, and K. Illmensee. 1981. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. II: Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation* 20:203 - 216.
- Jahn, L., B. Fouquet, K. Rohe, and W.W. Franke. 1987. Cytokeratins in certain endothelial and smooth muscle cells of two taxonomically distant vertebrate species, *Xenopus laevis* and man. *Differentiation* 36:234 - 254.
- Jahn, L., J. Kreuzer, E. von Hodenberg, W. Kübler, and W.W. Franke. 1993. Cytokeratins 8 and 18 in smooth muscle cells. Detection in human coronary artery, peripheral vascular, and vein graft disease and in transplantation-associated arteriosclerosis. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13:1631 - 1639.
- Janmey, P.A., U. Euteneuer, P. Traub, and M. Schliwa. 1991. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *Journal of Cell Biology* 113:155 - 166.
- Jepson, M.A., C.M. Mason, M.K. Bennett, N.L. Simmons, and B.H. Hirst. 1992. Co-expression of vimentin and cytokeratins in M cells of rabbit intestinal lymphoid follicle-associated epithelium. *Histochemical Journal* 24:33 - 39.
- Jessen, K.R., and R. Mirsky. 1980. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286:736-737.
- Joshi, H.C. 1994. Microtubule organizing centers and α -tubulin. *Current Opinion in Cell Biology* 6:55-62.
- Kalt, A. 1993. Molecular components of the centrosome. *Trends in Cell Biology* 3:118 - 128.
- Kasper, M. 1992. Immunhistochemische Untersuchungen zum Intermediärfilamentmuster der menschlichen Hypophyse und deren Adenome. *Acta Histochemica. Supplementband XLII*:221 - 223.
- Kasper, M., R. Moll, P. Stosiek, and U. Karsten. 1988. Distribution of intermediate filaments in human umbilical cord. Unusual triple expression of cytokeratins, vimentin, and desmin. *Zoologische Jahrbücher Abt. Anatomie* 117:227 - 233.
- Katsuma, Y., S.H. Swierenga, N. Marceau, and S.W. French. 1987. Connections of intermediate filaments with the nuclear lamina and the cell periphery. *Biology of the Cell* 59:193 - 203.

- Kelly, B.M., C.S. Gillespie, D.L. Sherman, and P.J. Brophy. 1992. Schwann cells of the myelin-forming phenotype express neurofilament NF-M. *Journal of Cell Biology* 118:397 - 410.
- Kim, K.H., J.G. Rheinwald, and E.V. Fuchs. 1983. Tissue-specificity of epithelial keratins: differential expression of mRNAs from two multigene families. *Molecular and Cellular Biology* 3:494 - 502.
- Kim, K.H., V. Stellmach, J. Javors, and E. Fuchs. 1987. Regulation of human mesothelial cells differentiation: Opposing roles of retinoids and epidermal growth factor in the expression of intermediate filament proteins. *Journal of Cell Biology* 105:3039 - 3051.
- Kooijman, M., M. Bloemendal, P. Traub, and R. Van Grondelle. 1992. Fluorescence study of the nucleic acid binding site of vimentin. *FEBS Letters* 302:177 - 180.
- Kopan, R., G. Traska, and E. Fuchs. 1987. Retinoids as important regulators of terminal differentiation: examining keratin expression in individual epidermal cells at various stages of keratinization. *Journal of Cell Biology* 105:427 - 440.
- Lai, Y.-S., S.N. Thung, M.A. Gerber, M.-L. Chen, and F. Schaffner. 1989. Expression of cytokeratins normal and diseased livers and in primary liver carcinomas. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 113:134 - 138.
- LaRocca, P., and J.G. Rheinwald. 1984. Coexpression of simple epithelial keratins and vimentin by human mesothelium and mesothelioma in vivo and in culture. *Cancer Research* 44:2991-2999.
- Laster, A.J., T. Itoh, T.J. Palker, and B.F. Haynes. 1986. The human thymic microenvironment: Thymic epithelium contains specific keratins associated with early and late stages of epidermal keratinocyte maturation. *Differentiation* 31:67 - 77.
- Lazarides, E. 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283:249 - 256.
- Lazarides, E. 1981. Intermediate filaments-chemical heterogeneity in differentiation. *Cell* 23:649 - 650.
- Lazarides, E. 1982. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annual Review of Biochemistry* 51:219 - 250.
- Lazarides, E., B.L. Granger, D.L. Gard, C.M. O'connor, J. Breckler, M. Price, and S.I. Danto. 1982. Desmin- and vimentin-containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in muscle cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 46:413-429.
- Lazarides, E., and B.D. Hubbard. 1976. Immunological characterization of the subunit of the 100 Å filaments from muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:4344 - 4348.
- Lee, L.D., and H.P. Baden. 1976. Organisation of the polypeptide chains in mammalian keratin. *Nature* 264:377 - 379.
- Lee, V., Wu H.L., and W.W. Schlaepfer. 1982. Monoclonal antibodies recognize individual neurofilament triplet proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:6089 - 6092.

- Lehdahl, U., L.B. Zimmermann, and R.D.G. McKay. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585 - 595.
- Lewis, S.A., W. Gu, and N.J. Cowan. 1987. Free intermingling of mammalian β -tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell* 49:539-548.
- Lin, F., and J.H. Worman. 1993. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *Journal of Biological Chemistry* 268:16321 - 16326.
- Little, M., and R.F. Luduena. 1985. Structural differences between brain β 1- and β 2-tubulins: implications for microtubule assembly and colchicine binding. *European Molecular Biology Organization Journal* 4:51-56.
- Lobeck, H., I. Bartke, K. Naujoks, D. Müller, G. Bronhöft, D. Mischke, and G. Wild. 1989. Verteilungsmuster der Zytokeratinpolypeptide 4 und 5 im normalen und neoplastischen Epithel unter Verwendung neuer paraffingängiger monoklonaler Antikörper (eine immunhistochemische Untersuchung). *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 73:645.
- Lobeck, H., U. Haase, F. Pfannkuch, D. Mischke, and G. Wild. 1986. Expressionsmuster definierter Zytokeratine in Normalepithel, Hyperplasien und Karzinomen der Schleimhaut des oberen Verdauungstraktes (eine immunhistochemische Untersuchung). *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 70:238 - 242.
- Lowey, S., and D. Risby. 1971. Light chains from fast and slow muscle myosin. *Nature* 234:81 - 85.
- Luby-Phelps, K. 1994. Physical properties of cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology* 6:3-9.
- Lynch, M.H., W.M. O'Guin, C Hardy, L. Mak, and T.-T. Sun. 1984. Acidic and basic hair/nail hard keratins and their co-localization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to soft keratins. *Journal of Cell Biology* 103:2593-2606.
- Mandelkow, E., and E.-M. Mandelkow. 1994. Microtubule structure. *Current Opinion in Structural Biology* 4:171 - 179.
- Mandelkow, E., and E.-M. Mandelkow. 1995. Microtubule and microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 7:72 - 81.
- Mandelkow, E., Y. H. Song, O. Schweers, A. Marx, and E. M. Mandelkow. 1995. On the structure of microtubules, tau, and paired helical filaments. *Neurobiology of Aging* 16:347-354.
- Mansbridge, J.N., and A.M. Knapp. 1987. Changes in the keratinocyte maturation during wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 89:253 - 262.
- Matoltsy, A.G. 1964. Prekeratin. *Nature* 201:1130 - 1131.
- Mayall, F.G., H. Goddard, and A.R. Bibbs. 1992. Intermediate filament expression in mesotheliomas: leiomyoid mesotheliomas are not uncommon. *Histopathology* 21:453-457.

- McNutt, M.A., J.W. Bolen, A.M. Gown, S.P. Hammar, and A.M. Vogel. 1985. Coexpression of intermediate filaments in human epithelial neoplasms. *Ultrastructural Pathology* 9:31 - 43.
- Merdes, A., F. Gounari, and S.D. Georgatos. 1993. The 47-kD lens-specific protein phakinin is a tailless intermediate filament protein and an assembly partner of filenin. *Journal of Cell Biology* 123:1507 - 1516.
- Miettinen, M., R. Clark, V.-P. Lehto, I. Virtanen, and I. Damjanov. 1985. Intermediate-filament proteins in parathyroid glands and parathyroid adenomas. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 109:986-989.
- Miettinen, M., R. Clark, and I. Virtanen. 1986. Intermediate filament proteins in choroid plexus and ependyma and their tumors. *American Journal of Pathology* 123:231 - 240.
- Miettinen, M., and K. Franssila. 1989. Immunohistochemical spectrum of malignant melanoma. The common presence of keratins. *Laboratory Investigation* 61:623 - 628.
- Miettinen, M., V.-P. Lehto, D. Dahl, and I. Virtanen. 1983. Differential diagnosis of chordoma, chondroid and ependymal tumors as aided by anti-intermediate filament antibodies. *American Journal of Pathology* 112:160 - 169.
- Miettinen, M., V.-P. Lehto, Badley R.A., and I. Virtanen. 1982. Expression of intermediate filaments in soft-tissue sarcomas. *International Journal of Cancer* 30:541 - 546.
- Miettinen, M., I. Virtanen, and A. Talerman. 1985. Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *American Journal of Pathology* 120:402 - 410.
- Mischke, D., and G. Wild. 1987. Polymorphic keratins in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 88:191 - 197.
- Moll, R. 1987. Diversity of cytokeratins in carcinomas. *Acta Histochemica. Supplementband XXXIV:37 - 44.*
- Moll, R. 1989. Intermediärfilamentmuster des Nephrons und des Urothels. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 73:314 - 320.
- Moll, Roland, ed. 1993. *Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren.* Edited by G. Seifert. Vol. 142, *Veröffentlichungen aus der Pathology (Progress in Pathology)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Moll, R., T. Achtstätter, E. Becht, J. Balcarova-Ständer, M. Ittensohn, and W.W. Franke. 1988. Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. *American Journal of Pathology* 132:123 - 144.
- Moll, R., G.A. Blobel, and W.W. Franke. 1984. Immunhistochemische und biochemische Analyse der Cytokeratin-Polypeptide der normalen Lunge und von Lungenkarzinomen. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 68:387.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982a. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia tumors and cultured cells. *Cell* 31:11 - 24.

- Moll, R., W.W. Franke, B. Volc-Platzer, and R. Krepler. 1982b. Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *Journal of Cell Biology* 95:285 - 295.
- Moll, R., C. Hage, and W. Thoenes. 1991. Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: Modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. *Laboratory Investigation* 65:74 - 86.
- Moll, R., A. Löwe, J. Laufer, and W.W. Franke. 1992. Cytokeratin 20 in human carcinomas. *American Journal of Pathology* 140:427 - 447.
- Moll, R., M. Osborn, W. Hartschuh, I. Moll, G. Mahrle, and K. Weber. 1986. Variability of expression and arrangement of cytokeratin and neurofilaments in cutaneous neuroendocrine carcinomas (Merkel cell tumors): immunocytochemical and biochemical analysis of twelve cases. *Ultrastructural Pathology* 10:473-495.
- Moll, R., S. Pitz, R. Levy, W. Weikel, W.W. Franke, and B. Czernobilsky. 1991. Complexity of expression of intermediate filament protein, in endometrial and ovarian adenocarcinomas. *Human Pathology* 22:989-1001.
- Moll, R., D.L. Schiller, and W.W. Franke. 1990. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *Journal of Cell Biology* 111:567 - 580.
- Moll, R., S. Winter, C. Zech, and W.W. Franke. 1987. Ein neues zytoplasmatisches Strukturprotein (46 000-Protein) mit eingeschränktem Expressionsspektrum: Potentieller histodiagnostischer Marker zur Unterscheidung metastatischer Adenokarzinome. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 71:526.
- Murphy, A., K.C. Breen, A. Long, C. Feighery, E.B. Casey, and D. Kelleher. 1993. Neurofilament expression in human T lymphocytes. *Immunology* 79:167 - 170.
- Nagle, R.B., M.L. Brawer, J. Kittelson, and V. Clark. 1991. Phenotypic relationship of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostatic carcinoma. *American Journal of Pathology* 138:119 - 128.
- Nelson, W.G., and T.-T. Sun. 1983. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *Journal of Cell Biology* 97:244 - 251.
- Ng, H.K., and S.T. Lo. 1989. Cytokeratin immunoreactivity in gliomas. *Histopathology* 14:359-368.
- Obermaier, G. 1991. Beitrag zur Klassifizierung und zum „Grading“ der Gliome des Boxerhundes nach neurohistologischen und immunhistochemischen Kriterien. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Ogawa, A., S. Sugihara, M. Hasegawa, A. Sasaki, Y. Nakazato, T. Kawada, S. Ishiuchi, and M. Tamura. 1990. Intermediate filament expression in pituitary adenomas. *Virchows Archiv B, Cell Pathology* 58:341-349.

- Osborn, M., M. Altmannsberger, G. Shaw, A. Schauer, and K. Weber. 1982. Various sympathetic derived human tumors differ in neurofilament expression. Use in diagnosis of neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and pheochromocytoma. *Virchows Archiv B, Cell Pathology* 40:141 - 156.
- Osborn, M., and K. Weber. 1982. Intermediate filaments: cell-type-specific markers in differentiation and pathology. *Cell* 31:303 - 306.
- Osborn, M., and K. Weber. 1983. Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Laboratory Investigation* 48:372 - 394.
- Paine, R., D. Gaposchkin, C. Kelly, and S.E. Wilcoxon. 1995. Regulation of cytokeratin expression in rat lung alveolar epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology* 269:L536-L544.
- Pankov, R., A. Umezawa, R. Maki, R.J. Der, C.A. Hauser, and R.G. Oshima. 1994. Oncogene activation of human keratin 18 transcription via the ras signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:873 - 877.
- Pauling, L., and R.B. Corey. 1953. Compound helical configurations of polypeptide chains: Structure of proteins of the α -keratin type. *Nature* 171:59 - 61.
- Pieper, F.R., F.A. Van de Klundert, J.M. Raats, J.B. Henderik, G. Schaart, F.C. Ramaekers, and H. Bloemendal. 1992. Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells. *European Journal of Biochemistry* 210:509 - 519.
- Portier, M.-M., B. De Néchaud, and F. Gros. 1983. Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. *Developmental Neuroscience* 6:335 - 344.
- Portier, M.M. 1992. The neuronal cytoskeleton - structural, functional, and dynamic aspects. *Revue Neurologique* 148:1 - 19.
- Pruss, R.M., R. Mirsky, M.C. Ruff, R. Thorpe, A.J. Dowding, and B.H. Anderton. 1981. All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell* 27:419 - 428.
- Quinlan, R.A., D.L. Schiller, M. Hatzfeld, T. Achstätter, R. Moll, J.L. Jorcano, T.M. Magin, and W.W. Franke. 1985. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:282 - 306.
- Ramaekers, F., A. Huysmans, G. Schaart, O. Moesker, and P. Vooijs. 1985. Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. *Experimental Cell Research* 170:235 - 249.
- Ramaekers, F.C.S., D Haag, A. Kant, O. Maesker, P.H.K. Jap, and G.P. Vooijs. 1983a. Coexpression of keratin and vimentin type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:2618 - 2622.
- Ramaekers, F.C.S., M. Osborn, E. Schmid, K. Weber, H. Bloemendahl, and W.W. Franke. 1980. Identification of the cytoskeleton proteins in lens-forming cells, special epitheloid cell type. *Experimental Cell Research* 127:309-327.

- Ramaekers, F.C.S., J. Puts, O. Moesker, A. Kant, P. Jap, and P. Vooijs. 1983b. Demonstration of keratin in human adenocarcinomas. *American Journal of Pathology* 111:213 - 223.
- Ramaekers, F.C.S., J.J.G. Puts, O. Moesker, A. Kant, A. Huysmans, D. Haag, P.H.K. Jap, C.J. Herman, and G.P. Vooijs. 1983c. Antibodies to intermediate filament proteins in immunohistochemical identification of human tumours: an overview. *Histochemical Journal* 15:691 - 713.
- Raymon, W.A., and A.S.-Y. Leong. 1989. Vimentin - a new prognostic parameter in breast carcinoma? *Journal of Pathology* 158:107-114.
- Remington, S.G. 1993. Chicken filensin: a lens fiber protein that exhibits sequence similarity to intermediate filaments. *Journal of Cell Science* 105:1057 - 1068.
- Rentrop, M., B. Knapp, H. Winter, and J. Schweizer. 1986. Differential localization of distinct keratin mRNA-species in mouse tongue epithelium by in situ hybridization with specific cDNA probes. *Journal of Cell Biology* 103:2583 - 2591.
- Roberson, M.D., A.D. Toews, J.F. Goddman, and P. Morell. 1992. Neurofilament and tubulin mRNA expression in schwann cells. *Journal of Neuroscience Research* 33:156-162.
- Rogers, M. A., H. Winter, L. Langbein, T. Krieg, and J. Schweizer. 1996. Genomic characterization of the human type I cuticular hair keratin hHa2 and identification of an adjacent novel type I hair keratin gene hHa5. *Journal of Investigative Dermatology* 107:633-638.
- Rudall, K.M. 1952. The proteins of the mammalian epidermis. *Advances in Protein Chemistry* 7:253 - 290.
- Rueger, D.C., J.S. Huston, D. Dahl, and A. Bignami. 1979. Formation of 100 Å filaments from purified glial fibrillary acidic protein in vitro. *Journal of Molecular Biology* 135:53-68.
- Ruppel, K.M., and J.A. Spudich. 1995. Myosin motor function: structural and mutagenic approaches. *Current Opinion in Cell Biology* 7:89 - 93.
- Santini, D., C. Ceccarelli, G. Mazzoleni, G. Pasquinelli, V.M. Jasonni, and G.N. Martinielli. 1993. Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry* 99:311 - 319.
- Schachner, M., E.T. Hedley-White, D.W. Hsu, G. Schoonmaker, and A. Bignami. 1977. Ultrastructural localisation of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling. *Journal of Cell Biology* 75:67-73.
- Schiffer, D., M.T. Giardana, A. Mugheli, G. Giaccone, S. Pezzotta, and A. Mauro. 1986. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Research* 374:110-118.
- Schiller, D.L., W.W. Franke, and B. Geiger. 1982. A subfamily of relatively large and basic cytokeratin polypeptides as defined by peptide mapping is represented by one or several polypeptides in epithelial cells. *European Molecular Biology Organization Journal* 1:761 - 769.

- Schlegel, R., S. Banks-Schlegel, J.A. McLeod, and G.S. Pinkus. 1980. Immunoperoxidase localization of keratin in human neoplasm. *American Journal of Pathology* 101:41 - 49.
- Schliwa, M. 1981. Proteins associated with cytoplasmatic actin. *Cell* 25:587-590.
- Schliwa, M. 1986. *The cytoskeleton. An introductory survey*. Vol. 13, *Cell Biol. Monographs*. Berlin: Springer Verlag.
- Schliwa, M., and J. Van Blerkom. 1981. Structural interaction of cytoskeletal components. *Journal of Cell Biology* 90:222-235.
- Schnitzer, J., W.W. Franke, and M. Schachner. 1981. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *Journal of Cell Biology* 90:91 - 103.
- Sejersen, T., and U. Lehdahl. 1993. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *Journal of Cell Science* 106:1291 - 1300.
- Semba, R., T. Asano, and K. Kato. 1990. Physiological expression of neuronal marker proteins in the heart of young rats. *Developmental Brain Research* 54:217 - 220.
- Shaw, G., M. Osborn, and K. Weber. 1981. An immunofluorescence study of the neurofilament triplet proteins, vimentin, and glial fibrillary acidic protein within adult rat brain. *European Journal of Cell Biology* 26:68 - 82.
- Shaw, G., and K. Weber. 1981. The distribution of the neurofilament triplet proteins within individual neurones. *Experimental Cell Research* 136:119 - 125.
- Shu, H. B., and H. C. Joshi. 1995. Gamma-tubulin can both nucleate microtubule assembly and self-assemble into novel tubular structures in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 130:1137-1147.
- Si, S.P., H.C. Tsou, and M. Peacocke. 1993. Cultured human melanocytes express the intermediate filament vimentin. *Journal of Investigative Dermatology* 101:383 - 386.
- Silberstein, L., S.G. Webster, M. Travis, and Blau H.M. 1986. Developmental progression of myosin gene expression in cultured muscle cells. *Cell* 46:1075 - 1081.
- Skoff, R., J. Heartfield, H. Maisel, and L.F. Eng. 1983. Glial fibrillary acidic protein localized in lens epithelium? *Transaction of the American Society of Neurochemistry* Abstract #37.
- Small, J.V., and A. Sobieszek. 1977. Studies on the function and composition of the 10-nm (100 Å) filaments of vertebrate smooth muscle. *Journal of Cell Science* 23:243 - 268.
- Stark, H.J., D. Breitkreutz, A. Limat, C.M. Ryle, D. Roop, I.M. Leigh, and N. Fusenig. 1990. Keratins 1 and 10 or homologues as regular constituents of inner root sheet and cuticle cells in the human hair follicle. *European Journal of Cell Biology* 52:359 - 372.
- Steinert, P.M. 1985. Intermediate Filaments: conformity and diversity of expression and structure. *Annual Review of Cell Biology* 1:41 - 65.

- Steinert, P.M. 1991. Organization of coiled-coil molecules in native mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments: evidence for alternating rows of antiparallel in-register and antiparallel staggered molecules. *Journal of Structural Biology* 107:157 - 174.
- Steinert, P.M. 1993a. Keratin intermediate filament structure. Cross linking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly. *Journal of Molecular Biology* 230:436 - 452.
- Steinert, P.M. 1993b. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *Journal of Investigative Dermatology* 100:729-734.
- Steinert, P.M., W.W. Idler, and S.B. Zimmermann. 1976. Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments in vitro. *Journal of Molecular Biology* 108:547 - 567.
- Steinert, P.M., L.N. Marekov, and D.A.D. Parry. 1993. Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that of keratin intermediate filaments. *Journal of Biological Chemistry* 268:24916 - 24925.
- Steinert, P.M., R.H. Rice, D.R. Roop, B.L. Trus, and A.C. Steven. 1983. Complete amino acid sequence of a mouse epidermal keratin subunit and implications for the structure of intermediate filaments. *Nature* 302:794 - 800.
- Steinert, P.M., and D.R. Roop. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annual Review of Biochemistry* 57:593 - 625.
- Steinert, P.M., A.C. Steven, and D.R. Roop. 1985. The molecular biology of intermediate filaments. *Cell* 42:411 - 419.
- Stellmach, V., A. Leask, and E. Fuchs. 1991. Retinoid-mediated transcriptional regulation of keratin genes in human epidermal and squamous cell carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:4582 - 4586.
- Sternlieb, J. 1965. Perinuclear filaments and microtubules in human hepatocytes and biliary epithelial cells. *Journal of Microscopy* 4:551 - 558.
- Stewart, M. 1993. Intermediate filament structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 5:3 - 11.
- Stewart, M., R.A. Quinlan, and R.D. Moir. 1989. Molecular interactions in paracrystals of a fragment corresponding to the α -helical coiled-coil rod portion of glial fibrillary acidic protein: antiparallel packing of molecules and polymorphism related to intermediate filament structure. *Journal of Cell Biology* 109:225 - 234.
- Stoler, A., R. Kopan, M. Duvic, and E. Fuchs. 1988. Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *Journal of Cell Biology* 107:427 - 446.
- Stosiek, P., M. Kasper, and R. Moll. 1992. Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. *Virchows Archiv A* 421:133 - 141.
- Stossel, T.P. 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260:1086 - 1094.

- Stossel, T.P., C. Chaponnier, R.M. Ezzel, J.H. Hartwig, P.A. Janmey, D.J. Kwiatkowski, S.E. Lind, D.B. Smith, F.S. Southwick, H.L. Yin, and K.D. Zanar. 1985. Nonmuscle actin-binding proteins. *Annual Review of Cell Biology* 1:353-402.
- Stratcher, A., ed. 1983. *Muscle and Nonmuscle motility*. Vol. 1, Academic Press. New York.
- Sun, T.T., R. Eichner, A. Schermer, D. Cooper, W.G. Nelson, and R.A. Weiss. 1984. Classification, expression, and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: a unifying model. *Cancer* 1:169 - 176.
- Sun, T.T., S.C.G. Tseng, A.J.-W. Huang, D. Cooper, A. Schermer, M.H. Lynch, R. Weiss, and R. Eichner. 1985. Monoclonal antibody studies of mammalian keratins: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:307 - 329.
- Swynghedauw, B. 1986. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiological Reviews* 66:710 - 771.
- Tezuka, T., and I.M. Freedberg. 1972. Epidermal structural proteins. II. Isolation and purification of tonofilaments of the newborn rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 263:382 - 396.
- Thornell, L.-E., A. Erikssojn, B. Joansson, U. Kjörrell, W.W. Franke, I. Virtanen, and V.-P. Lehto. 1985. Intermediate filament and associated proteins in heart purkinje fibers: a membrane-myofibril anchored cytoskeletal system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:213-240.
- Tokuyasu, K.T., A.H. Dutton, and S.J. Singer. 1983. Immunelectron microscopic studies of desmin (skeletal) localisation and intermediate filament organisation in chicken skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 96:1727-1735.
- Tomic, M., C.-K. Jiang, H.S. Epstein, I.M. Freedberg, H.H. Samuels, and M. Blumenberg. 1990. Nuclear receptors for retinoic acid and thyroid hormone regulate transcription of keratin genes. *Cell Regulation* 1:965 - 973.
- Traub, P., S. Kuhn, and S. Grub. 1993. Separation and characterization of homo- and hetero-oligomers of the intermediate filament proteins desmin and vimentin. *Journal of Molecular Biology*. 230:837 - 856.
- Traub, P., E. Mothes, R.L. Shoeman, R. Schroder, and A. Scherbath. 1992. Binding of nucleic acids to intermediate filaments of the vimentin type and their effects on filament formation and stability. *Journal of Biomolecular Structures & Dynamics* 10:505 - 531.
- Traub, P., and R.L. Shoeman. 1994. Intermediate filament proteins: cytoskeletal elements with a gene-regulatory function? *International Review of Cytology* 154:1 - 103.
- Traweck, S.T., J Liu, and H. Battifora. 1993. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. *American Journal of Pathology* 142:1111 - 1118.
- Trevor, K.T., J.G. McGuire, and E.V. Leonova. 1995. Association of vimentin intermediate filaments with the centrosome. *Journal of Cell Science* 108:343-356.
- Tseng, S.C.G., M.J. Jarvinen, W.G. Nelson, J.-W. Huang, J. Woodcock-Mitchell, and T.-T. Sun. 1982. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell* 30:361-372.

- Vale, R.D., J.M. Scholey, and M.P. Sheetz. 1986. Kinesin: possible biological roles for a new microtubule motor. *Trends in Biochemical Sciences* 11:464-468.
- Van Muijen, G.N.P., D.J. Ruiter, and S.O. Warnaar. 1987. Coexpression of intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. *Laboratory Investigation* 57:359 - 369.
- Viale, G., C. Doglioni, P. Dell'Orto, G. Zanetti, P. Iozzolino, L. Bontempini, and G. Coggi. 1988. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in human respiratory tract cartilages and pulmonary chondromatous hamartomas. *American Journal of Pathology* 133:363 - 373.
- Vilafranca, M., M. Domingo, and L. Ferrer. 1994. Tubular vimentin metaplasia in canine nephropathies. *Research in Veterinary Science* 57:248 - 250.
- Vilafranca, M., P. Wohlsein, and G. Trautwein. 1994. Evidence of cytokeratin expression in canine visceral glomerular epithelial cells in vivo. *Research in Veterinary Science* 57:39-44.
- Vinores, S.A., E. Van Niel, H.J. Kim, and P.A. Campochiaro. 1992. Simultaneous expression of keratin and glial fibrillary acidic protein by the same cells in epiretinal membranes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 33:3361-3366.
- Wade, R.H., and D. Chretien. 1993. Cryoelectron microscopy of microtubules. *Journal of Structural Biology* 110:1 - 27.
- Waldherr, R., and K. Schwachheimer. 1985. Co-expression of cytokeratin and vimentin intermediate-sized filaments in renal carcinomas. Comparative study of the intermediate-sized filament distribution in renal cell carcinomas and in normal human kidney. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 408:15 - 27.
- Wang, E. 1985. Intermediate filament associated proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:32-56.
- Weber, K., and N. Geisler. 1982. The structural relation between intermediate filament proteins in living cells and the α -keratins of sheep wool. *European Molecular Biology Organization Journal* 1:1155 - 1160.
- Weber, K., and N. Geisler. 1984. Intermediate filaments - from wool α -keratins to neurofilaments: a structural overview. *Cancer Cells 1/ The Transformed Phenotype. Cold Spring Harbor Laboratory*:153 - 159.
- Weber, K., and N. Geisler. 1985. Intermediate filaments: structural conservation and divergence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:126-143.
- Weber, K., and M. Osborn. 1982. The cytoskeleton. *National Cancer Institute Monograph* 60:31-46.
- Weber, K., and M. Osborn. 1986. Die Moleküle des Zellskeletts. In *Die Moleküle des Lebens.*, edited by P. Sitte. Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft.
- Weber, K., R. Pollack, and T. Bibring. 1975. Antibody against tubulin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72:459-463.

- Weiss, R.A., R. Eichner, and T.T. Sun. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-Kdalton keratin as molecular marker for hyperproliferative keratinocytes. *Journal of Cell Biology* 98:1397 - 1406.
- Whalen, R.G. 1985. Myosin isoenzymes as molecular markers for muscle physiology. *Journal of Experimental Medicine* 115:45 - 53.
- Wild, G. A., H. Lobeck, and D. Mischke. 1987. Keratinexpression im normalen und maligne transformierten Plattenepithel der Kopfdarmschleimhaut. *Laryngologie, Rhinologie, Otologie (Stuttgart)* 66:615-21.
- Wild, G.A., and D. Mischke. 1986. Variation and frequency of cytokeratin polypeptide patterns in human squamous non-keratinizing epithelium. *Experimental Cell Research* 162:114 - 126.
- Wong, L., B. Oakley, A. Lawton, and Y. Shiba. 1994. Keratin 19-like immunoreactivity in receptor cells of mammalian taste buds. *Chemical Senses* 19:251 - 264.
- Woodcock-Mitchell, J., S.R. Rannels, J. Mitchell, D.E. Rannels, and R.B. Low. 1989. Modulation of cytokeratin expression in type II pneumocytes by the extracellular matrix. *American Review of Respiratory Disease* 139:343 - 351.
- Xu, Z., D. L.-Y. Dong, and D.W. Cleveland. 1994. Neuronal intermediate filaments: new progress on an old subject. *Current Opinion in Neurobiology* 4:655 - 661.
- Yaffe, M., G. Farr, D. Miklos, A. Horwich, M. Sternlicht, and H. Sternlicht. 1992. TCP-1 complex is molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* 358:245-248.
- Yen, S.H., and K.L. Fields. 1981. Antibodies to neurofilaments, glial filaments, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. *Journal of Cell Biology* 88:115 - 126.
- Yuspa, S.H., and C.C. Harris. 1974. Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate in vitro. *Experimental Cell Research* 86:95 - 105.
- Zehner, Z.E., and B.M. Paterson. 1985. The chicken vimentin gene: aspects of organization during myogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 455:79 - 94.
- Zheng, Y.X., M.L. Wong, B. Alberst, and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring. *Nature* 378:579-583.

2.2 Sonstige Marker

Neben den Intermediärfilamenten können weitere zelltypische oder organspezifische Strukturen, Produkte u. ä. als Tumormarker zur Charakterisierung von Geweben herangezogen werden. Ganz allgemein sind Tumormarker krebs-assoziierte Signalsubstanzen eines neoplastischen Geschehens, die in oder auf Tumorzellen gebildet oder in ihrer Umgebung induziert werden. Die meisten dieser Marker haben Protein-, Lipid- und/oder Kohlehydratcharakter und sind frei zirkulierend im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten meßbar, wobei ihre Konzentration als Summe aus Tumormarker-Expression, -Synthese, -Freisetzung, -Katabolismus, -Exkretion, der Tumorblutversorgung, der Tumormasse und -Ausbreitung resultiert. Sie werden herangezogen, um:

- (a) Gesunde Probanden zu screenen,
- (b) einen spezifischen Typ von Neoplasie zu diagnostizieren,
- (c) Entwicklungsstadien von Tumoren zu bestimmen,
- (d) prognostische Aussagen treffen zu können und/oder
- (e) den Verlauf einer Therapie zu überwachen.

Da einige dieser Marker auch im Gewebe immunhistochemisch nachweisbar sind, werden die wichtigsten nachfolgend besprochen.

Tumorantigene

Tumorantigene sind in der Regel onkofetale Substanzen, die im Embryo oder Fetus gebildet werden, postnatal verschwinden und bei bestimmten Neoplasien wieder nachweisbar sind:

Alpha-Fetoprotein (AFP)

Das AFP ist ein Glykoprotein von etwa 64 kD Molekulargewicht, das im Fetalstadium von Dottersackzellen, von Zellen im Darm und in der Leber produziert wird und Sequenzähnlichkeiten mit Albumin aufweist (Gitlin and Boesman 1966; Gitlin and Boesman 1967; Klöppel 1986). Seine physiologische Funktion ist unklar. Postnatal wird die AFP-Synthese zurückgefahren; serologisch erhöhtes Vorkommen wird in den meisten Fällen von Leberzellkarzinomen und Keimzelltumoren beobachtet. Allerdings können auch andere Ursachen eine Erhöhung der

AFP-Konzentration bewirken (Shibata and Yamanaka 1988). Antikörper gegen AFP können auch zur immunhistochemischen Abklärung primärer Leberzellkarzinome herangezogen werden (Hahn and Richardson 1995; Lowseth et al. 1991; Mulas et al. 1995); allerdings gelingt beim Menschen der AFP-Nachweis in Leberzellkarzinomen zu sehr unterschiedlichen Prozentsätzen (Klöppl 1986).

Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Das CEA war eines der ersten beschriebenen onkofetalen Antigene (Gold and Freedman 1965). Es ist ein Glykoproteinkomplex von etwa 20 kD, das assoziiert an der Plasmamembran von Tumorzellen vorkommt und ins Blut entlassen wird. Ursprünglich wurde angenommen, daß das CEA nur in Colonkarzinomen vorkomme. Später zeigte sich, daß außer Karzinomen des Magen-Darm-Traktes auch Neoplasien von Pankreas, Mamma, Lunge und Schilddrüse, ebenso wie entzündliche Veränderungen eine Exprimierung verursachen (Klöppl 1986; Lobeck et al. 1987; Pflatz et al. 1987; Popper and Wirnsberger 1986; Schröder et al. 1986). Sein Haupteinsatzgebiet ist das Monitoring von Krebspatienten (American Society of Clinical Oncology 1996). Auch beim Tier läßt sich CEA serologisch (Berg and Rüsse 1994; Hassig et al. 1991) und immunhistochemisch (Ferrer et al. 1990; Mulas et al. 1995; Ribas et al. 1989) nachweisen. Der Einsatz in der Immunhistochemie ist allerdings umstritten, da die Antikörper gegen CEA mit einer ganzen Gruppe von ähnlichen Glykoproteinen – *Non-specific Cross-Reacting Antigen* – kreuzreagieren (Eveleigh 1974; Haskell et al. 1983; Kleist, Chavanel, and Burtin 1972).

Prostatic specific antigen (PSA)

Das Prostata-spezifische Antigen ist ein Glykoprotein von 33–34 kD Molekulargewicht (Wang et al. 1979), das beim Menschen ausschließlich von Prostatazellen (orthologischen und pathologischen) gebildet wird und physiologischer Weise im Ejakulat gelartige Proteine abbaut. Beim Hund ist das PSA serologisch nicht und immunhistochemisch nur sehr schwach nachweisbar (Bell et al. 1995).

Karbohydrat-Tumormarker

In der Humanmedizin werden eine Vielzahl weiterer Tumormarker – serologisch und immunhistochemisch – eingesetzt (American Society of Clinical Oncology 1996), die bisher allerdings kaum Einzug in die veterinärmedizinische Diagnostik gefunden haben (Haines et al. 1989). Einige dieser Marker werden nachfolgend kurz vorgestellt:

CA19-9 (CA=Carbohydrate Antigen) wurde initial in Patienten mit kolorektalem Karzinomen entdeckt (Koprowski et al. 1979); allerdings kann es auch in Neoplasien von Pankreas, Leber und Magen nachgewiesen werden (Atkinson et al. 1982). Der Antikörper gegen CA 19-9 reagiert mit einem Sialyderivat, einer Modifizierung des menschlichen Lewisa-Blutgruppenantigens, das allerdings nicht nur in Adenokarzinomen des Magen-Darm-Traktes, sondern auch des Pankreas und anderen Karzinomen nachgewiesen werden kann (Atkinson et al. 1982; Hakomori and Kannagi 1983).

CA 15-3 ist ein Kohlenhydratantigen der Milchfettkugelchenmembranen des Menschen und wird als Verlaufsparemeter bei Mammakarzinomen eingesetzt (Hilkens et al. 1984).

CA 125 ist ein Antigen, das auf über 80 % der nichtmuzinösen Ovarialkarzinomen exprimiert wird. Daneben reagiert CA 125 unter anderem auch mit Tumoren der Mamma, des Ovars, des Pankreas und der Lunge (Koelma et al. 1987).

Enzym-Marker

Neben Enzymen wie α -1-Chymotrypsin, α -1-Trypsin und Lysozyme (Muramidase) als typische Bestandteile von Blut- und Knochenmarkszellen (Fondevila et al. 1989; Goranov 1978; Isaacson, Jones, and Judd 1979; Mason and Taylor 1975; Moore 1986; Motoi, Stein, and Lennert 1980) sind Chymase und Trypsin typische Enzyme in Mastzellen (Caughey et al. 1987; Welle et al. 1995) und werden ebenso wie Esterasen, Saure und Alkalische Phosphatasen oder Peroxidasen (Colbatzky and Hermanns 1990; Grindem, Stevens, and Perman 1986; Jösten 1995; Kuczka 1987), als Detektionssysteme für Neoplasien ausgehend von diesen Zellen eingesetzt. Allerdings limitieren hohe Ansprüche an die Probenpräparation (Frische, Fixation), Verlust des Enzymbesatzes in entdifferenzierten Zellen sowie heterogenes und nicht immer reproduzierbares Färbeverhalten den Einsatz (Grindem 1996; Grindem, Stevens, and Perman 1986; Jain et al. 1988; Jain et al. 1991; Madewell, Jain, and Munn 1991).

Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Die Enolase ist ein Enzym (2-Phospho-D-Glyzerat-Hydrolase), das in der Glykolyse eine Rolle spielt. Sie katalysiert die Umwandlung von 2-Phosphoglyzerat in Phosphoenolpyruvat (Rider and Taylor 1974; Schmechel 1985). Das Enzym hat ein Molekulargewicht von etwa 80.000 D und kommt in verschiedenen Isoformen vor, die sich aus Dimeren von drei unterschiedlichen Untereinheiten (, ,) zusammensetzen (Heimoto et al. 1985). In vielen Geweben liegt die Enolase als Homo- oder Heterodimer vor (Rider and Taylor 1974): Das α -Isoenzym

kommt ubiquitär im Körper vor, das β -Isoenzym im Herzmuskel, das $\beta\beta$ -Isoenzym im Skelettmuskel und α -, β - bzw. γ -Varianten im ZNS (Heimoto et al. 1985; Schmechel 1985). Wegen ihrer starker Anreicherung im Gehirn, wurde die α -Variante als Neuronen-spezifische Enolase angesehen (Schmechel 1985). NSE kommt auch in reifen Neuronen und neuroendokrinen Zellen des APUD-Systems (Schmechel, Marangos, and Brightman 1978), in Geschmacksrezeptoren (Takas-haki et al. 1984) sowie in Merkelzellen der Haut (Vinores et al. 1984) vor.

Da NSE allerdings in glatten Muskelzellen, in Myoepithelien, in Lymphozyten und Thrombozyten, in nahezu sämtlichen Gehirntumoren, in „APUDomen“ wie Karzinoiden, Paragangliomen, Inselzelltumoren oder medullären Schilddrüsenkarzinomen ebenso nachweisbar ist wie in Karzinomen der Mamma und des Ovars, ist seine Bedeutung als Tumormarker zugunsten „spezifischerer“ Marker zurückgedrängt worden (Hafner 1987; Heimoto et al. 1985; Hewicker and Trautwein 1991; Schröder et al. 1992; Schwechheimer 1986; Vos et al. 1993).

Plazentare Alkalische Phosphatase (PLAP)

Die Plazentaren Alkalischen Phosphatasen sind eine Isoenzymfamilie der alkalischen Phosphatase. Sie sind nicht mit PSA verwandt. Die PLAP ist ein sensibler Marker von Keimzelltumoren des Menschen, vor allem von Seminomen, und wird seit den achtziger Jahren in der Diagnostik von Keimzelltumoren erfolgreich eingesetzt (Hustin, Collette, and Franchimont 1987; Jacobson and Norgaard-Pedersen 1984; Manivel et al. 1987). Caninen Hodentumoren ist die PLAP zwar deutlich dem Intermediärfilamenttyping überlegen, färbt jedoch nicht alle Neoplasien zufriedenstellend (Schulze 1995).

Prostatic Acid Phosphatase (PAP)

Die PAP ist eine Saure Phosphatase, wird von normalen Drüsenzellen der Prostata sezerniert und katalysiert die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern (Aumüller and Seitz 1985). Sie gilt als serologischer Marker, der regelmäßig bei Prostataneoplasien erhöht beobachtet werden kann und ist nicht mit PSA verwandt. Immunhistochemisch zeigt sie ein zuverlässiges, aber heterogenes Färberegebnis; kann allerdings auch bei Inselzelltumoren nachgewiesen werden (Vernon and Williams 1983). Beim Mammatumor der Frau kann sie als zusätzliches Prognosekriterium eingesetzt werden (Yu et al. 1995). Beim Hund ist die PAP zwar nachweisbar (Aumüller et al. 1990; Aumüller et al. 1987), scheint aber keine suffiziente Differenzierung oder Prognoseerstellung zu ermöglichen (Bell et al. 1995; McEntee, Isaacs, and Smith 1987).

Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

MMPs sind eine Enzymfamilie, die alle Komponenten der extrazellulären Matrix remodellieren und auflösen können und bei Neoplasien überexprimiert werden (Matrisian 1992). Unkontrollierte MMP-Aktivität scheint einen Gewebeschaden zu induzieren, der es Tumorzellen erlaubt, in das umgebende Gewebe und in Gefäße einzudringen. Zu den Matrix Metalloproteinasen gehören u.a. verschiedene Kollagenasen, die fibrilläres Kollagen und Proteoglykane abbauen, sogenannte Gelatinasen, die die Kollagentypen IV, V, VII, X und Elastin verdauen sowie sogenannte Stromelysine und Matrilysine, deren Substrate Proteoglykane, Prokollagene, Kollagene, Elastin, Fibronectin sind (Liotta, Thorgeirsson, and Garbisa 1982; Santavicca et al. 1995). Neben Fibroblasten kommen MMPs auch in Drüsenepithelien (Saarialho Kere, Crouch, and Parks 1995) vor. Beim Hund sind Matrix Metalloproteinasen bisher nur beim Mastzellentumor näher untersucht, wobei Mastzellenchymase die MMPs aktiviert (Fang et al. 1996).

Hormonrezeptoren

Der Nachweis von Hormonrezeptoren wird in der Humanmedizin korreliert mit Prognose und Therapierbarkeit von Neoplasien.

Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Die Aussagekraft des Nachweises von Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren in caninen Neoplasien muß in der Veterinärmedizin zur Zeit noch sehr kritisch betrachtet werden (Caselitz 1984; Donnay et al. 1995; Elling and Staimer 1981; Hünnerbein and Gutberlet 1997; Larsen and Grier 1989; Manzel 1995; Sartin et al. 1992). In der Humanmedizin scheint eine direkte Korrelation zwischen Hormonrezeptorexpression und Prognose sowie Ansprechen auf Hormontherapie zu bestehen (Ferrer Roca, Ramos, and Diaz Cardama 1995; Gordon 1995; Stierer et al. 1995)

Androgenrezeptoren

Seit kurzem stehen der Humanmedizin Antikörper gegen Androgenrezeptoren zur Verfügung, so daß hier eine Prognose und Therapierbarkeit ähnlich wie bei den Östrogen- und Progesteronrezeptoren versucht wird (Ruizeveld de Winter et al. 1991). Die meisten Prostatakarzinome des Mannes (aber auch Hodenkarzinome, Kolonkarzinome und auch Mammakarzinome) weisen Androgenrezeptoren auf, deren Nachweis antihormonelle Therapien einschätzbar macht (Ruizeveld de Winter et al. 1991). Erste (nichtimmunhistochemische) Nachweise am Hund

(Mann et al. 1995) sind gelungen und zeigen Behandlungsperspektiven auf (Juniewicz et al. 1993).

Tissue Polypeptide Antigen (TPA)

Das TPA ist einer der ersten überhaupt entdeckten Markern, die bei bestimmten epithelialen Tumoren im Serum nachgewiesen werden konnten (Beham et al. 1986; Björklund and Björklund 1957). Neuere Untersuchungen konnten allerdings zeigen, daß es sich beim TPA um eine Mischung der Zytokeratine 8, 18 und 19 handelt (Weber et al. 1984). TPA färbt immunhistochemisch dementsprechend auch nur nicht-epidermale Epithelien (Moll 1987).

Epithelial Membrane Antigen (EMA)

Beim EMA handelt es sich um eine Gruppe von Antikörpern, die gegen menschliche Milchfettkugelchenmembranen gerichtet ist (Heyderman, Steele, and Ormerod 1979). EMA-Antikörper markieren vor allem luminale Mammaepithelien; andere Epithelien werden oft heterogen gefärbt (Moll 1986). Allerdings reagiert das EMA auch mit Plasmazytome und T-Zell-Lymphome (Delsol et al. 1984), weshalb es Zytokeratinen deutlich unterlegen ist (Pinkus, Etheridge, and O'Connor 1986). Einige der in der Humanmedizin verwendeten Antikörper reagieren offensichtlich beim Hund nicht (Magnol et al. 1985)

Chromogranin

Chromogranine (Banks and Helle 1965) sind saure sekretorische Proteine, die in den Sekretgranula von normalen und neoplastischen Zellen des sogenannten diffusen neuroendokrinen Systems (Pearse 1977) nachgewiesen werden können. Heute sind drei verschiedene Chromogranine bekannt: Chromogranin A (MG = 48 kD), Chromogranin B (MG = 76 kD), auch Sekretogranin I bezeichnet und Chromogranin C (MG 67 kD), auch Sekretogranin II genannt (Cetin 1992; Lloyd et al. 1988). Tumoren des neuroendokrinen Systems wie Paragangliome inkl. Phaeochromozytome, medulläre Schilddrüsenkarzinome, aber auch Karzinoide, enthalten Chromogranine (Lloyd et al. 1988; Schröder et al. 1992).

S-100 Protein

S-100 ist ein saures, relativ kleines, thermolabiles Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 10.000 und 25.000 D, das in mindestens 8 Isoformen vorliegt (Donato 1991; Emoto et al. 1992) und bei allen Säugetieren vorkommt (Moore 1982). Die genaue Funktion von S-100 ist bis heute nicht geklärt. Bekannt ist, daß

S-100 Kalzium binden kann und den Disassembly von Mikrotubuli induziert. Moore (Moore 1965; Moore and McGregor 1965) beschrieb erstmals dieses Protein, von dem er annahm, daß es typisch für Nervengewebe sei, da er es hauptsächlich in Gliazellen lokalisieren konnte. Wegen seiner Löslichkeit in 100%igem Ammoniumsulfat bei neutralem pH, wurde es als S-100 Protein bezeichnet (Hydén and McEwen 1966; Moore 1965; Moore and McGregor 1965). Isobe et al. (1978) konnten zeigen, daß S-100 eine Mischung von zwei ähnlichen Proteinen – S-100a mit einer α - und einer β -Untereinheit und S100b mit einer β , β -Untereinheit – ist, wobei die α -Einheit 93 und die β -Einheit 91 Aminosäuren enthält.

S-100 ist in einer Vielzahl von Geweben und Zellen nachgewiesen worden: In Melanozyten, Langerhans Zellen (Haut), Chondrozyten, Naevi, Myoepithelzellen (Schweiß-, Speicheldrüsen und Mamma), Lipozyten, Hypophyse, Peyersche Platten, sowie in Uferzellen, Sinusmakrophagen, interdigitierenden und in dentritischen Retikulumzellen der Lymphknoten (Clark et al. 1982; Cocchia, Michetti, and Donato 1981; Donhuijsen, Metz, and Leder 1988; Gaynor, Irie, and Morton 1980; Gillet, Bobrow, and Millis 1990; Höfler, Walter, and Denk 1984; Kahn et al. 1983; Kato, Suzuki, and Nakajima 1983; Moller and Hellmén 1994; Nakajima et al. 1982a; Nakajima et al. 1982b; Nakajima, Yamaguchi, and Takahashi 1980; Nakamura, Becker, and Marks 1983; Sandusky, Carlton, and Wightman 1985; Stefansson, Wollmann, and Jerkovic 1982; Stefansson, Wollmann, and Moore 1982; Sugimura et al. 1990; Takahashi, Fujita, and Okabe 1991; Takahashi et al. 1984).

Anhand von DNA-Sequenzanalysen ist heute eine relativ große Familie S-100 ähnlicher Proteine bekannt: u.a. p11, CF (cystic fibrosis)-Antigen, Calcyclin, 18A2, 42A, 42C und p9ka (Kligman and Hilt 1988). Daher sind Untersuchungen, die mit polyklonalen S-100-Antikörper durchgeführt wurden, mit Vorbehalt zu interpretieren, da bei vielen Antikörpern nicht geklärt ist, ob sie nur mit S-100 reagieren oder auch mit den anderen Proteinen.

Von Willebrand Faktor (Factor VIII related Antigen)

Der von Willebrand Faktor (vWF), ehemals: Faktor VIII assoziiertes Antigen, ist ein komplexes adhäsives Glykoproteinpolymer mit einem heterogenen MG zwischen $0,5$ und 20×10^6 D, das von Endothelzellen (Jaffe, Hoyer, and Nachman 1973) und Megakaryozyten (Nachman, Levine, and Jaffe 1977) synthetisiert wird. Im Körper ist der vWF

- (a) nichtkonvalent an Faktor VIII gebunden im Plasma zu finden (Foster and Girma 1989),
- (b) extrazellulär an Basalmembranen und
- (c) intrazellulär in Weibel-Palade-Granula von Endothelzellen (Wagner, Olmstedt, and Marder 1982) und Thrombozyten zu finden (Foster and Girma 1989).

Seine physiologische Bedeutung liegt in der Unterstützung der intravaskulären, zellulären Blutgerinnung (Foster and Girma 1989). Einerseits indem inaktive Thrombozyten über bestimmte Oberflächenrezeptoren an geschädigte Gefäßareale gebunden werden und andererseits indem aktivierte Thrombozyten mit den Kollagenfibrillen der Endothelzellen verbunden werden (Jaffe, Hoyer, and Nachman 1973; Meyer and Girma 1993; Roth 1992; Wagner 1990).

Wegen seiner Konzentration in Endothelzellen kann der vWF immunhistochemisch als Marker für Endothelien (Mukai, Rosai, and Burdorf 1980) und für Neoplasien endotheliale Ursprungs (Beust et al. 1988) eingesetzt werden. Die Prognose maligner Transformationen hängt wesentlich von einer Metastasierung ab, wobei die vaskuläre bzw. die lymphatische Invasion einer Neoplasie den Hauptmechanismus bei der Ausbreitung von Tumorzellen bildet. Allerdings ist der Einbruch von Tumorzellen in kleine Gefäße und Kapillaren in Routineschnitten oft schwierig nachzuweisen bzw. gegen ein Einwachsen von Geschwulstzapfen in Gewebespalten zu differenzieren. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß der Nachweis von vWF geeignet ist, einen Gefäßeinbruch von Tumorzellen darzustellen (Gutberlet and Rudolph 1994; Martin, Perez-Reyes, and Mendelsohn 1987).

Literatur „Sonstige Marker“

- American Society of Clinical Oncology. 1996. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 14:2843-2877.
- Atkinson, B.F., C.S. Ernst, M. Herlyn, Z. Steplewski, H.F. Sears, and H. Koprowski. 1982. Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Research* 60:658-667.
- Aumüller, G., and J. Seitz. 1985. Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases. VI: Immunoelectron microscopic studies on human prostatic and leukocytic acid phosphatases. *Prostate* 7:161-9.
- Aumüller, G., J. Seitz, H. Lilja, P. A. Abrahamsson, H. von der Kammer, and K. H. Scheit. 1990. Species- and organ-specificity of secretory proteins derived from human prostate and seminal vesicles. *Prostate* 17:31-40.
- Aumüller, G., H. Vedder, U. Enderle-Schmitt, and J. Seitz. 1987. Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases VII: Immunohistochemistry of canine prostatic acid phosphatase. *Prostate* 11:1-15.

- Banks, P., and K. Helle. 1965. The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochemical Journal* 97:40c-41c.
- Beham, A., W. Weybora, E. Lackinger, H. Denk, V. Björklund, and B. Björklund. 1986. Distribution of TPA and cytokeratins in gastrointestinal carcinomas as revealed by immunohistochemistry. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 409:641 - 655.
- Bell, F. W., J. S. Klausner, D. W. Hayden, E. M. Lund, B. B. Liebenstein, D. A. Fee-ney, S. D. Johnston, J. L. Shivers, C. M. Ewing, and W. B. Isaacs. 1995. Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 9:149-53.
- Berg, G., and M. Rüsse. 1994. Der Einsatz von Baypamun HK in der Mammatumorbehandlung der Hündin. *Tierärztliche Umschau* 49:476-480.
- Beust, B.R. von, M.M. Suter, B.A. Summers, and B.R. Von Beust. 1988. Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Veterinary Pathology* 25:251 - 255.
- Björklund, B., and V. Björklund. 1957. Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique. *International Archives of Allergy* 10:153-184.
- Caselit, F. 1984. Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Mammagewebe und Mammatumorgewebe der Hündin. Inauguraldissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Caughey, G.H., N.F. Viro, J. Ramachandran, S.C. Lazarus, D.B. Borosn, and J.A. Nadel. 1987. Dog mastocytoma tryptase: affinity purification, characterization, and amino-terminal sequence. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 258:555-558.
- Cetin, Y. 1992. Chromogranin A immunoreactivity and Grimelius` argyrophilia. A correlative study in mammalian endocrine cells. *Anatomy and Embryology* 185:207 - 215.
- Clark, H.B., Cruz Santa, D., B.K. Hartman, and B.W. Moore. 1982. S100 an immunohistochemical marker for malignant melanoma and other melanocytic lesions. *Laboratory Investigation* 46:13 A.
- Cocchia, D., F. Michetti, and R. Donato. 1981. Immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 294:85 - 87.
- Colbatzky, F., and W. Hermanns. 1990. Über das Vorkommen riesenzelliger Tumoren (Osteoklastome) bei der Katze. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 103:430.
- Delsol, G., K. C. Gatter, H. Stein, W. N. Erber, K. A. Pulford, K. Zinne, and D. Y. Mason. 1984. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. Implications for diagnosis of human neoplasms. *Lancet* 2:1124-9.
- Donato, R. 1991. Perspectives in S-100 protein biology. *Cell Calcium* 12,:713 - 726.
- Donhuijsen, K., K. Metz, and L.-D. Leder. 1988. Desmin- und S-100-Protein-positive maligne fibröse Histiozytome: praktische und theoretische Implikationen. *Pathologie* 9:261 - 267.

- Donnay, I., J. Rauis, N. Devleeschouwer, P. Wouters Ballman, G. Leclercq, and J. Versteegen. 1995. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *American Journal of Veterinary Research* 56:1188-1194.
- Elling, H., and S. Staimer. 1981. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Oestrogen- und Progesteronrezeptoren in Mammatumoren des Hundes. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 94:468-471.
- Emoto, Y., R. Kobayashi, H. Akatsuka, and H. Hidaka. 1992. Purification and characterization of a new member of the S-100-protein family from human placenta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 182:1246 - 1253.
- Eveleigh, J. W. 1974. Proceedings: Heterogeneity of carcinoembryonic antigen. *Cancer Research* 34:2122-4.
- Fang, K. C., W. W. Raymond, S. C. Lazarus, and G. H. Caughey. 1996. Dog mastocytoma cells secrete a 92-kD gelatinase activated extracellularly by mast cell chymase. *Journal of Clinical Investigation* 97:1589-96.
- Ferrer, L., R. M. Rabanal, D. Fondevila, and N. Prats. 1990. Immunocytochemical demonstration of intermediate filament proteins, S-100 protein and CEA in apocrine sweat glands and apocrine gland derived lesions of the dog. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 37:569-576.
- Ferrer Roca, O. F., A. Ramos, and A. Diaz Cardama. 1995. Immunohistochemical correlation of steroid receptors and disease-free interval in 206 consecutive cases of breast cancer: validation of telequantification based on global scene segmentation. *Analytic Cellular Pathology* 9:151-63.
- Fondevila, D, L Ferrer, JA Ramos, V Montane, and AJ Ramis. 1989. Immunohistochemical localization of S-100 protein and lysozyme in canine lymph nodes and lymphomas. *Journal of Veterinary Medicine+++ A Animal Physiology+++ Pathology and Clinical Veterinary Medicine*. 36:71 - 77.
- Foster, P.A., and J.P. Girma. 1989. Von Willebrand Factor: structure and function. *Blood Reviews* 3:180-191.
- Gaynor, R., R. Irie, and D. und Morton, Herschman, H.R. 1980. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* 286:400 - 4001.
- Gillet, CE, LG Bobrow, and RR Millis. 1990. S 100 protein in human mammary tissue immunoreactivity in breast carcinoma, including Paget's disease of the nipple, and value as a marker of myoepithelial cells. *Journal of Pathology* 160:19 - 24.
- Gitlin, D., and M. Boesman. 1966. Serum alpha-fetoprotein, albumin, and gamma-Globulin in the human conceptus. *J Clin Invest* 45:1826-38.
- Gitlin, D., and M. Boesman. 1967. Sites of serum alpha-fetoprotein synthesis in the human and in the rat. *J Clin Invest* 46:1010-6.
- Gold, P., and S.O. Freedman. 1965. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *Journal of Experimental Medicine* 121:439-462.

- Goranov, H. 1978. Comparative studies of lysozyme (muramidase) activity in blood cells of some laboratory and farm animals. *Veterinarnomeditsinski Nauki* 15:41-45.
- Gordon, N. H. 1995. Association of education and income with estrogen receptor status in primary breast cancer. *American Journal of Epidemiology* 142:796-803.
- Grindem, C. B. 1996. Blood cell markers. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 26:1043-1064.
- Grindem, C.B., J.B. Stevens, and V. Perman. 1986. Cytochemical reactions in cells from leukemic dogs. *Veterinary Pathology* 23:103-109.
- Gutberlet, K., and R. Rudolph. 1994. Immunohistochemical identification of vessels in cancer cell invasion in canine mammary tumours. *European Journal of Veterinary Pathology* 1:11-14.
- Hafner, A. 1987. Elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchung der neuronalen Elemente der Riechschleimhaut des Hundes und lichtmikroskopische und immunhistochemische Charakterisierung spontaner Riechschleimhauttumoren bei Hund und Katze. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hahn, K. A., and R. C. Richardson. 1995. Detection of serum alpha-fetoprotein in dogs with naturally occurring malignant neoplasia. *Veterinary Clinical Pathology* 24:18-21.
- Haines, D.M., G. Matte, A.A. Wilkinson, A.A. Noujaim, C. Turner, and B.M. Longenecker. 1989. Immunohistochemical staining and radionuclide imaging of canine tumors, using a monoclonal antibody recognizing a synthetic carbohydrate antigen. *American Journal of Veterinary Research* 50:875 - 881.
- Hakomori, S.I., and R. Kannagi. 1983. Glycolipid tumor differentiation markers. *Journal of the National Cancer Institute* 71:231-235.
- Haskell, C. M., F. Buchegger, M. Schreyer, S. Carrel, and J. P. Mach. 1983. Monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen: ionic strength as a factor in the selection of antibodies for immunoscintigraphy. *Cancer Research* 43:3857-64.
- Hassig, M., M. Casal, B. von Beust, M. Nussbaumer, P. Rusch, and B. Von Beust. 1991. CEA-Test beim Haustier. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 133:311-313.
- Heimoto, H., Y. Takahashi, T. Koshikawa, and H. Nagura. 1985. Immunohistochemical localization of gamma-enolase in normal human tissues of non-nervous and non-neuroendocrine systems. *Laboratory Investigation* 52:257-263.
- Hewicker, M., and G. Trautwein. 1991. Identifizierung von Zellen des Zentralnervensystems mittels zellspezifischer Marker. *Tierärztliche Praxis* 19:241 - 246.
- Heyderman, E., K. Steele, and M. G. Ormerod. 1979. A new antigen on the epithelial membrane: its immunoperoxidase localisation in normal and neoplastic tissue. *Journal of Clinical Pathology* 32:35-9.
- Hilkens, J., F. Buijs, J. Hilgers, P. Hageman, J. Calafat, A. Sonnenberg, and M. van der Valk. 1984. Monoclonal antibodies against human milk fat globulin membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *International Journal of Cancer* 34:197-206.

- Höfler, H., G.F. Walter, and H. Denk. 1984. Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and in pituitary adenomas. *Acta Neuropathologica (Berlin)* 65:35 - 40.
- Hünerbein, P., and K. Gutberlet. 1997. Immunhistochemische Untersuchungen zum Rezeptorprofil verschiedener caniner Mammatumoren – ein Hilfsmittel zur Prognosestellung? Paper read at 40. Tagung der Fachgruppe Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 20. Mai 1997, at Berlin.
- Hustin, J., J. Collette, and P. Franchimont. 1987. Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours. *International Journal of Andrology* 10:29-35.
- Hydén, H., and B. McEwen. 1966. A glial protein specific for the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55:354 - 358.
- Isaacson, P., D.B. Jones, and M.A. Judd. 1979. A-1-antitrypsin in human macrophages. *Lancet* 8149:964 - 965.
- Isobe, T., A. Tsugita, and T. Okuyama. 1978. The amino acid sequence and the subunit structure of bovine brain S-100 protein (PAP I-b). *Journal of Neuroscience* 30:921 - 923.
- Jacobson, G.K., and B. Norgaard-Pedersen. 1984. Placental alkaline phosphatase in testicular germ tumours and in carcinoma-in-situ of the testis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A Pathology* 92:323-329.
- Jaffe, E.A., L.W. Hoyer, and R.L. Nachman. 1973. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 52:2757 - 2767.
- Jain, N. C., H. Hirmand, S. DeVries, and C. S. Kono. 1988. A comparison of cytochemical techniques to demonstrate peroxidase activity in canine leukocytes. *Veterinary Clinical Pathology* 17:87-89.
- Jain, N. C., G. J. Kociba, M. A. Thrall, J. T. Blue, J. D. Krehbiel, J. G. Zinkl, C. B. Grindem, K. S. Latimer, J. W. Harvey, and R. E. Raskin. 1991. Proposed criteria for classification of acute myeloid leukemia in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology* 20:63-82.
- Jösten, M. 1995. Differenzierung zwischen Geschwulst-Riesenzellen und osteoklastenähnlichen Riesenzellen in Neoplasien von Katzen und Hunden am immun- und enzymhistochemisch gefärbten Paraffinschnitt. Inaugural-Dissertation, FB Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin.
- Juniewicz, P. E., S. J. Hoekstra, B. M. Lemp, T. A. Barbolt, J. A. Devin, E. Gauthier, G. Frenette, J. Y. Dube, and R. R. Tremblay. 1993. Effect of combination treatment with zanoterone (WIN 49596), a steroidal androgen receptor antagonist, and finasteride (MK-906), a steroidal 5 alpha-reductase inhibitor, on the prostate and testes of beagle dogs. *Endocrinology* 133:904-13.
- Kahn, H.J., A. Marks, Thom H., and R. Baumal. 1983. Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology. *American Journal of Clinical Pathology* 79:341 - 347.

- Kato, K., F. Suzuki, and T. Nakajima. 1983. S-100 protein in adipose tissue. *International Journal of Biochemistry* 15:609 - 613.
- Kleist, S. von, G. Chavanel, and P. Burtin. 1972. Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69:2492-4.
- Kligman, D., and D.C. Hilt. 1988. The S100 protein family. *Trends in Biochemical Sciences* 13:437 - 443.
- Klöppel, G. 1986. Diagnostische Schwerpunkte der Tumormarker: Gastrointestinale Tumoren. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 70:159 - 171.
- Koelma, I.A., M. Nap, C.J. Rodenburg, and G.J. Fleuren. 1987. The value of tumour marker CA 125 in surgical pathology. *Histopathology* 11:287-294.
- Koprowski, H., Z. Stepkowski, K. Mitchell, M. Herlyn, and P. Fuhrer. 1979. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genetics* 5:957-972.
- Kuczka, A. 1987. Zur makroskopischen und histologischen Beurteilung des Knochenmarkes beim Hund. Inaugural-Dissertation, Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Larsen, A. E., and R. L. Grier. 1989. Evaluation of canine mast cell tumors for presence of estrogen receptors. *American Journal of Veterinary Research* 50:1779-1780.
- Liotta, L. A., U. P. Thorgeirsson, and S. Garbisa. 1982. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* 1:277-288.
- Lloyd, R.V., M. Cano, P. Rosa, A. Hille, and W.B. Huttner. 1988. Distribution of chromogranin A and secretogranin I (chromogranin B) in neuroendocrine cells and tumors. *American Journal of Pathology* 130:296 - 304.
- Lobeck, H., M. Beiswenger, A. Reichelt, W. Zuschneid, D. Mischke, and G. Wild. 1987. Intermediärfilamente und karzinoembryonales Antigen (CEA) in Pankreas- kopf- und Papillenkarcinomen sowie deren Vorstufen (eine semiquantitative Studie). *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 71:294 - 298.
- Lowseth, L. A., N. A. Gillett, I. Y. Chang, B. A. Muggenburg, and B. B. Boecker. 1991. Detection of serum alpha-fetoprotein in dogs with hepatic tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 199:735-741.
- Madewell, B. R., N. C. Jain, and R. J. Munn. 1991. Unusual cytochemical reactivity in canine acute myeloblastic leukaemia. *Comparative Haematology International* 1:117-120.
- Magnol, J.P., T. Al Saati, G. Delsol, and T. Al. Saati. 1985. Immunocytochemical labeling of canine carcinoma cyokeratins. *Revue de Medecine Veterinaire*. 136:357 - 362.
- Manivel, J. C., J. Jessurun, M. R. Wick, and L. P. Dehner. 1987. Placental alkaline phosphatase immunoreactivity in testicular germ-cell neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology* 11:21-9.

- Mann, F. A., D. J. Nonneman, E. R. Pope, H. W. Boothe, W. V. Welshons, and V. K. Ganjam. 1995. Androgen receptors in the pelvic diaphragm muscles of dogs with and without perineal hernia. *American Journal of Veterinary Research* 56:134-139.
- Manzel, O. 1995. Immunhistochemische Darstellung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Gewebeschnitten des Hundes. Inauguraldissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Martin, S.A., N. Perez-Reyes, and G. Mendelsohn. 1987. Angiovasion in breast carcinoma. An immunohistochemical study of factor VIII related antigen. *Cancer* 59:1918 - 1922.
- Mason, D.Y., and C.R. Taylor. 1975. The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. *Journal of Clinical Pathology* 28:124 - 132.
- Matrisian, L.M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14:455-463.
- McEntee, M, W Isaacs, and C Smith. 1987. Adenocarcinoma of the canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. *Prostate* 11:163 - 170.
- Meyer, D., and J.P. Girma. 1993. Von Willebrand factor: Structure and function. *Thrombosis and Haemostasis* 70:99-104.
- Moll, R. 1986. Epitheliale Tumormarker. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 70:28 - 50.
- Moll, R. 1987. Epithelial tumor markers: cytokeratins and tissue polypeptide antigen (TPA). In *Morphological tumor markers.*, edited by G. Seifert. Berlin: Springer Verlag.
- Moller, A.C., and E. Hellmén. 1994. S100 protein is not specific for myoepithelial cells in the mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* 110:49 - 55.
- Moore, B.W. 1965. A soluble protein characteristic of nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19:739 - 744.
- Moore, B.W. 1982. Chemistry and biology of S-100 protein. *Scandinavian Journal of Immunology Supplement* 15 (9):53-74.
- Moore, B.W., and D. McGregor. 1965. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *Journal of Biological Chemistry* 240:1647 - 1653.
- Moore, P.F. 1986. Characterization of cytoplasmic lysozym immunoreactivity as a histiocytic marker in normal canine tissues. *Veterinary Pathology* 23:763 - 769.
- Motoi, M., H. Stein, and K. Lennert. 1980. Demonstration of lysozyme, A1-antichymotrypsin A1-antitrypsin Albumin And transferrin with the immunoperoxidase method in lymph node cells. *Virchows Archiv B, Cell Pathology* 35:73 - 82.
- Mukai, K., J. Rosai, and W.H.C Burdorf. 1980. Localisation of factor VIII-related antigen in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method. *American Journal of Surgical Pathology* 4:273 - 276.

- Mulas, J. Martín de las , J. C. Gomez Villamandos, J. Perez, E. Mozos, M. Estrada, and A. Mendez. 1995. Immunohistochemical evaluation of canine primary liver carcinomas: distribution of alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, keratins and vimentin. *Research in Veterinary Science* 59:124-127.
- Nachman, R., R. Levine, and E.A. Jaffe. 1977. Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *Journal of Clinical Investigation* 60:914 - 921.
- Nakajima, T., T. Kameja, S. Watanabe, T. Hirota, Y. Sato, and Y. Shimosato. 1982a. An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. *Am. J. Surg. Pathol.* 6:715 - 727.
- Nakajima, T., S. Watanabe, Y. Sato, T. Kameya, Y. Shimosato, and K. Ishihara. 1982b. Immunohistochemical demonstration of S100 Protein in malignant melanoma and pigmented nevus and its diagnostic application. *Cancer* 50:912 - 918.
- Nakajima, T., H. Yamaguchi, and K. Takahashi. 1980. S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Research* 191:523 - 531.
- Nakamura, Y., L.E. Becker, and A. Marks. 1983. S-100 protein in tumors of cartilage and bone. An immunohistochemical study. *Cancer* 52:1820 - 1824.
- Pearse, A.G.E. 1977. The diffuse neuroendocrine system and the APUD concept: related "endocrine" peptides in brain, intestine, pituitary, placenta, and anuran cutaneous glands. *Medical Biology* 55:115 - 125.
- Pflatz, M., B. Odermatt, B. Christen, and J.R. Rüttner. 1987. Immunohistochemistry in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 411:387 - 393.
- Pinkus, G. S., C. L. Etheridge, and E. M. O'Connor. 1986. Are keratin proteins a better tumor marker than epithelial membrane antigen? A comparative immunohistochemical study of various paraffin-embedded neoplasms using monoclonal and polyclonal antibodies. *American Journal of Clinical Pathology* 85:269-77.
- Popper, H., and G. Wirnsberger. 1986. Tumormarker in der Differentialdiagnose maligner Lungen- und Pleuratumoren. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 70:317 - 320.
- Ribas, J.L., H. Mena, K.G. Braund, I.A. Sesterhenn, and M. Toivio Kinnucan. 1989. A histologic and immunocytochemical study of choroid plexus tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 26:55 - 64.
- Rider, C.C., and C.B. Taylor. 1974. Enolase isoenzymes in rat tissues: electrophoretic, chromatographic, and kinetic properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 365:285 - 300.
- Roth, G.J. 1992. Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunology Today* 13:100 - 105.
- Ruizeveld de Winter, J. A., J. Trapman, M. Vermey, E. Mulder, N. D. Zegers, and T. H. van der Kwast. 1991. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39:927-36.

- Saarialho Kere, U. K., E. C. Crouch, and W. C. Parks. 1995. Matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in adult human exocrine epithelium. *Journal of Investigative Dermatology* 105:190-6.
- Sandusky, G.E., Jr., W.W. Carlton, and K.A. Wightman. 1985. Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. *Veterinary Pathology* 22:577 - 581.
- Santavicca, M., A. Noel, M. P. Chenard, Y. Lutz, I. Stoll, J. P. Segain, N. Rouyer, M. C. Rio, C. Wolf, and J. P. Bellico. 1995. Characterization of monoclonal antibodies against stromelysin-3 and their use to evaluate stromelysin-3 levels in breast carcinoma by semi-quantitative immunohistochemistry. *International Journal of Cancer* 64:336-41.
- Sartin, E. A., S. Barnes, R. P. Kwapien, and L. G. Wolfe. 1992. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 53:2196-2200.
- Schmechel, D., J.P. Marangos, and M. Brightman. 1978. Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276:834 - 836.
- Schmechel, D.E. 1985. -Subunit of the glycolytic enzyme enolase: nonspecific or neuron-specific. *Laboratory Investigation* 52:239 - 242.
- Schröder, S., B. Dockhorn-Dworniczak, G. Klöppel, H. Kastendieck, G. Delling, W.W. Franke, and W. Bäcker. 1986. Die Bedeutung der Immunhistologie für Diagnostik, Prognosebeurteilung und Therapieplanung maligner Schilddrüsentumoren. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 70:279 - 284.
- Schröder, S., B.C. Padberg, E. Achilles, K. Holl, H. Dralle, and G. Klöppel. 1992. Immunocytochemistry in adrenocortical tumours: a clinicomorphological study of 72 neoplasms. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 420:65 - 70.
- Schulze, C. 1995. Immunhistologische Charakterisierung der Präkanzerose testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) bei Keimzelltumoren des Hundes. Inauguraldissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin.
- Schwechheimer, K. 1986. Nervale Tumormarker. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 70:82 - 103.
- Shibata, H., and H. Yamanaka. 1988. Changes in dog serum alpha-fetoprotein levels in acute liver injuries induced by hepatotoxins. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 41:88-92.
- Stefansson, K., R. Wollmann, and M. Jerkovic. 1982. S-100 protein in soft-tissue tumors derived from Schwann cells and melanocytes. *American Journal of Pathology* 106:261 - 268.
- Stefansson, K., R.L. Wollmann, and B.W. Moore. 1982. S-100 protein in human chondrocytes. *Nature* 295:63 - 64.

- Stierer, M., H. Rosen, R. Weber, H. Hanak, L. Auerbach, J. Spona, and H. Tuchler. 1995. A prospective analysis of immunohistochemically determined hormone receptors and nuclear features as predictors of early recurrence in primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 36:11-21.
- Sugimura, M., D. Shirogane, Y. Atoji, Y. Suzuki, K. Ohshima, Y. Kon, and Y. Hashimoto. 1990. A comparative study on s-100 protein-immunoreactive cells in lymph nodes. *Japanese Journal of Veterinary Science* 52:1015 - 1021.
- Takahashi, H., S. Fujita, and H. Okabe. 1991. Immunohistochemical characterization of basal cell adenomas of the salivary gland. *Pathology, Research and Practice* 187:145 - 156.
- Takahashi, K., I. Toshiaki, Y. Ohtsuki, H. Sonobe, I. Takeda, and T. Akagi. 1984. Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. *American Journal of Pathology* 116:497 - 503.
- Takashaki, S., T. Iwanaka, Y. Takahashi, Y. Nakano, and T. Fujita. 1984. Neuron-specific enolase, neurofilament protein, and S-100 protein in the olfactory mucosa of human fetuses. An immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research* 238:231-234.
- Vernon, S. E., and W. D. Williams. 1983. Pre-treatment and post-treatment evaluation of prostatic adenocarcinoma for prostatic specific acid phosphatase and prostatic specific antigen by immunohistochemistry. *Journal of Urology* 130:95-8.
- Vinore, S.A., J.M. Bonnin, L.J. Rubinstein, and P.J. Marangos. 1984. Immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in neoplasms of the CNS and other tissues. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 108:536-540.
- Vos, J.H., T.S.G.A.M. van den Ingh, F.C.S. Ramaekers, R.F. Molenbeek, M. de Neijs, F.N. van Mil, D. Ivanyi, M. De Neijs, and F.N. Van Mil. 1993. The expression of keratins, vimentin, neurofilament proteins, smooth muscle actin, neuron-specific enolase, and synaptophysin in tumours of the specific glands in the canine anal area. *Veterinary Pathology* 30:352 - 361.
- Wagner, D.D. 1990. Cell biology of von Willebrand factor. *Annual Review of Cell Biology* 6:217 - 246.
- Wagner, D.D., J.B. Olmstedt, and V.J. Marder. 1982. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Journal of Cell Biology* 95:355 - 360.
- Wang, M. C., L. A. Valenzuela, G. P. Murphy, and T. M. Chu. 1979. Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology* 17:159-63.
- Weber, K., M. Osborn, R. Moll, B. Wiklund, and B. Luning. 1984. Tissue polypeptide antigen (TPA) is related to the non-epidermal keratins 8, 18 and 19 typical of simple and non-squamous epithelia: re-evaluation of a human tumor marker. *European Molecular Biology Organization Journal* 3:2707-14.
- Welle, M.M., S.M. Proske, I.T. Harvima, and N.M. Schechter. 1995. Demonstration of tryptase in bovine cutaneous and tumor mast cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43:1139-1144.

Yu, H., M. Gai, E. P. Diamandis, D. Katsaros, D. J. Sutherland, M. A. Levesque, R. Roagna, R. Ponzone, and P. Sismondi. 1995. Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Research* 55:2104-10.

2.3 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie hat sich in den letzten Jahren zu einer unersetzbaren histologischen Technik im Rahmen des „decision-making process“ bei der Tumordiagnostik entwickelt (Altmannsberger 1988; Baumal et al. 1984; Denk 1986; Ducatelle, Hoorens, and Maenhout 1986; Erlandson 1984; Fritz et al. 1985; Gatter et al. 1985; Landes et al. 1990; Leong 1993; Sandusky, Carlton, and Wightman 1986). Das Prinzip der Immunhistochemie beruht darauf, mit Hilfe von Antikörpern¹ gewebliche (Immun-HISTO-Chemie) oder zelluläre (Immun-ZYTO-Chemie) Antigene, die exogenen (z.B. Viren) oder endogenen Ursprungs sein können (eutope Antigene z.B. Zytoskelettbestandteile oder ektope Antigene wie z.B. CAE), morphologisch zuordenbar im histologischen oder zytologischen Präparat zu visualisieren. Dieses Sichtbarmachen einer stattgefundenen Reaktion geschieht mit Hilfe von verschiedenen Markern, die unmittelbar oder mittelbar über Antikörper das Antigen darstellen: Fluorochrommarker, die durch Anregung von UV-Licht zum Fluoreszieren² gebracht werden, oder Markern wie Enzymen, Biotin-Avidin, Isotopen oder Partikel (Erythrozyten, Latex, Ferritin, Gold, Silber), die nach Zugabe von Substraten oder aufgrund spezieller Eigenschaften sichtbar werden.

Theoretische Prinzipien der Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie unterscheidet man neben den eingesetzten Markern prinzipiell direkte von indirekten Techniken (Tabelle 2.3-1). Die ersten Versuche

1 Die zum Nachweis bestimmter Antigene eingesetzten Antikörper werden üblicherweise nach dem Antigen benannt (z.B. anti-Desmin). Bei bestimmten Antigenen, die unterschiedliche Varianten haben wie zum Beispiel die Zytokeratine, wird das genaue Antigen benannt.; zum Beispiel anti-Zytokeratin 8/18. Es hat sich dabei eingebürgert den Präfix “anti” wegzulassen, um statt korrekt von z.B. anti-Vimentin nur von Vimentin zu sprechen, oder es wird nur der eingesetzte Klon genannt (z.B. AE1 oder KL1).

2 Unter Fluoreszenz wird eine charakteristische Leuchterscheinung von Stoffen verstanden, die zeitgleich bei der Bestrahlung mit einer bestimmten Anregungswellenlänge auftritt; bei der Immunfluoreszenz wird durch Anregung mit UV-Licht eine Emission von langwelligeren Strahlung im sichtbaren Bereich ausgelöst.

Tabelle 2.3-1

Übersicht über immunhistochemische Methodik

Markersubstanzen	Direkte Methode	Indirekte Methode
Fluorochrome Partikel	Direkte Immunfluoreszenz Gold, Silber, Ferritin, Iso - tope, Latex, Biotin, Erythro - zyten	Indirekte Immunfluoreszenz Gold, Silber, Ferritin, Isotope, Latex, Biotin, Erythrozyten, Im- mungold/-silber, Avidin-Biotin- Ferritin
Enzyme	Meerrettichperoxidase, al - kalische Phosphatase, Gluko- seoxidase, β -Galak tosidase	wie direkte Methode
Enzym-Immun - komplexe		Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP), alkalische Phospha- tase-anti-alkalische Phospha- tase (APAAP)
(Strept)Avidin-Bio- tin mit En zymen	labeled Avidin-Biotin (LAB)	Avidin-Biotin-Complex (ABC), labeled Avidin-Biotin (LAB), bridged Avidin-Biotin (BRAB); Catalyzed Signal Amplifikation (CSA)
Enzym-Dextran- Polymer	Enhanced Polymer One - Step Staining (EPOS)	EnVision™-2-Schritt-Technik

mit Hilfe von markierten Antikörpern Antigene in Geweben nachzuweisen wurden bereits in den 30iger Jahren unternommen.

Insbesondere die Arbeiten von Reiner (1930) und Heidelberger et al. (1933) mit Hilfe von Azofarbstoffen Antikörper zu markieren waren dabei bahnbrechend, gerieten allerdings wegen der äußerst geringen Sensitivität wieder in Vergessenheit.

Bei den direkten Techniken (**Einschritttechnik**) ist der spezifische gegen das zu suchende Antigen gerichtete Antikörper (Primärantikörper) direkt mit einem „Label“ konjugiert, das nach der Antigen-Antikörper-Reaktion visualisiert wird (Abbildung 2.3-1).

Bei den indirekten Techniken, auch Sandwichtechniken genannt, werden unmarkierte Primärantikörper verwendet, die in einem oder mehreren Schritten mit sekundären oder tertiären „labeled“ Antikörpern versetzt werden.

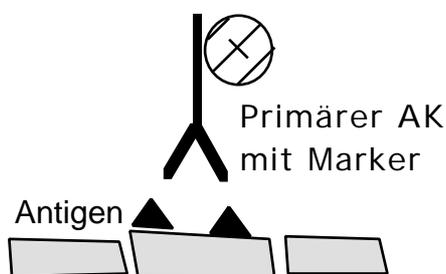
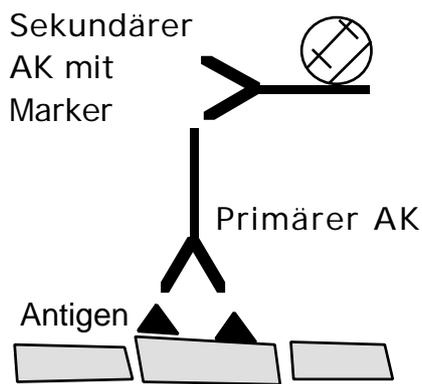


Abbildung 2.3-1

Prinzip der Einschritttechnik: Der markierte, spezifisch gegen das Antigen gerichtete Antikörper bindet an das Antigen. Der Marker reagiert mit seinem nachfolgend zugegebenen Substrat zu einem Farbprodukt und lokalisiert so das Antigen

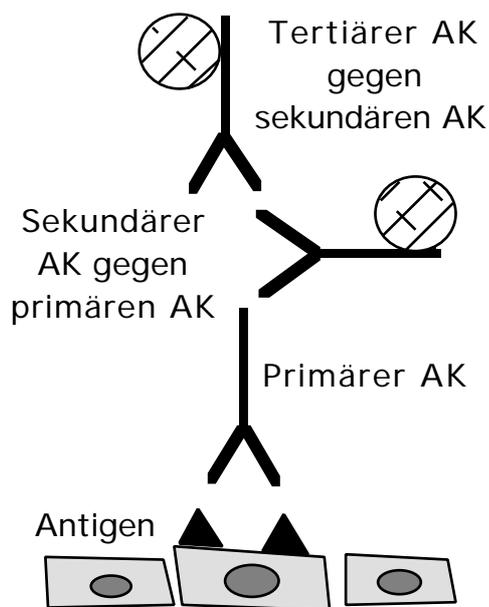
**Abbildung 2.3-2**

Indirekte Technik: Der unmarkierte, spezifisch gegen das Antigen gerichtete Antikörper reagiert mit dem Antigen. Der konjugierte Sekundäantikörper ist gegen den Primäantikörper gerichtet und kann nach seiner Bindung visualisiert werden.

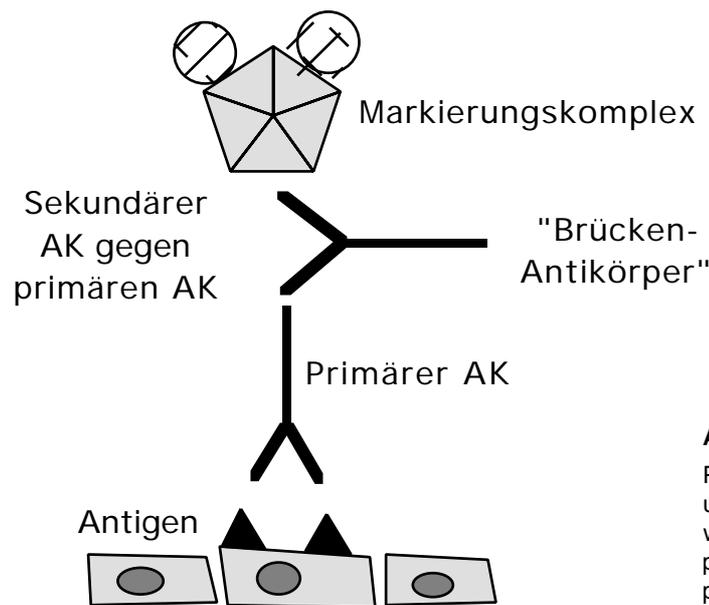
Der einfachste Fall einer indirekten Methode ist die **Zweischritttechnik** (Abbildung 2.3-2): Der unmarkierte Primäantikörper reagiert mit dem Antigen. Markierte Sekundäantikörper (Konjugate) bzw. markiertes Staphylokokken-Protein A (Biberfeld 1975; Dubois-Dalcq, McFarland, and McFarlin 1977; Notani, Parsons, and Erlandsen 1979) oder markiertes Streptokokken-Protein G (Hsu, Raine, and Fanger 1981b), die an das Fc-Fragment des unmarkierten Primäantikörpers binden können, werden aufgetragen und können nach spezifischer Reaktion ihrer Marker visualisiert werden.

Da sich mehrere Sekundäantikörper an den Primäantikörper binden, wird die Reaktion im Vergleich zur 1-Schritt-Technik verstärkt.

Eine Variation dieser indirekten Technik ist die „**Enzyme-Labeled Antigen Method**“: Der unmarkierte Primäantikörper wird im Überschuß aufgetragen, so daß

**Abbildung 2.3-3**

Prinzip der Dreischritttechnik: Nach der Bindung des unkonjugierten Primäantikörpers (z.B. aus der Maus) an das Antigen, wird ein markierter Sekundäantikörper (z.B. aus Kaninchen) gerichtet gegen Maus, und schließlich ein konjugierte Tertiäantikörper (z.B. aus Ziege) gerichtet gegen Kaninchen

**Abbildung 2.3-4**

Prinzip der Brückentechnik: Der unmarkierte Primärantikörper wird über einen Brückenantikörper mit einem Markierungskomplex verbunden.

lediglich eine Valenz an das Antigen bindet. Dann wird das markerkonjugierte Antigen zugegeben, das von der freien Valenz des Primärantikörpers gebunden (Falini et al. 1982) und visualisiert wird.

Eine weitere Verstärkung der Reaktion wird durch **Dreischritttechniken** erzielt: Nach Inkubation mit unmarkiertem Primärantikörper und nachfolgend mit markiertem Sekundärantikörper, wird ein dritter markierter Antikörper, der gegen den Sekundärantikörper gerichtet ist, aufgetragen (Abbildung 2.3-3).

Eine Variation der Dreischritttechnik ist die **Brückentechnik**: Ein unmarkierter Brückenantikörper verbindet den Primärantikörper mit einem Markierungskomplex, der je nach Methode (siehe weiter hinten) unterschiedlich zusammengesetzt sein kann (Abbildung 2.3-4).

Da bei der Ankoppelung der Marker an Antikörper die Avidität der Immunglobuline und die Enzymreaktion verändert werden, wurden schon relativ früh **unmarkierte Antikörpertechniken** („unlabeled antibody methods“) als Brückentechnik erprobt (Mason et al. 1969; Sternberger 1969). Dabei werden nach dem Auftragen von Primär- und Sekundärantikörper lösliche Enzym-anti-Enzymantikörper eingesetzt. Primärantikörper und anti-Enzymantikörper stammen aus derselben Spezies und der Sekundärantikörper, der gegen diese Spezies-IgG gerichtet ist, verbindet als Brückenantikörper beide.

Schließlich lässt sich durch Einsatz von **Mehrfachtechniken** die Nachweisempfindlichkeit weiter verstärken, indem z.B. Sekundär- und/oder Tertiärantikörper wiederholt aufgetragen werden.

Neben der Vorgehensweise (direkte oder indirekte Methoden) spielen für den Einsatz dieser Methoden unterschiedliche Markersysteme und Markierungskomplexe eine Rolle.

Markersubstanzen und -systeme

Der Nachweis einer stattgefundenen Reaktion kann entweder mit Markern, die direkt an die Antikörper gekoppelt sind (konjungierte Methode oder „labeled methods“) oder mittels Enzymkomplexen, die nicht an Antikörper gebunden sind (unkonjungierte Methode oder „unlabeled methods“) erfolgen. Die direkten Techniken und die Zweischritt- bzw. Dreischrittechniken sind immer sogenannte „labeled methods“, während die Brückenmethoden „unlabeled methods“ sind. Als Konjugate werden die markierten Antikörper bezeichnet.

Fluorochrome

Bereits Hopkins et al. (1933), Fieser et al. (1939) und Creech et al. (1941) versuchten sich darin, Fluorochrome an Antikörper zu koppeln; scheiterten allerdings, da die verwendeten Substanzen die Antikörper zerstörten. Die eigentliche Geschichte der Immunhistochemie beginnt mit den Arbeiten der Gruppe um Coons (Coons et al. 1942; Coons, Creech, and R.N. 1941; Coons and Kaplan 1950) und Fagraeus (1948), denen es schließlich gelang, fluoreszierende Farbstoffe an Antikörper zu binden, wobei als differenzierendes Fluorochrom 1950 Fluoreszein-Isozyanat eingeführt wurde (Coons and Kaplan 1950). Seit 1958 werden Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) (Marshall, Eveland, and C.W. 1958) oder Tetramethyl-Rhodamin-Isothiozyanat (TRITC) (Hiramoto, Engel, and Pressman 1958) als wichtigste Fluorochrome zum Markieren von Antikörpern auch heute noch verwendet. Die Gruppe um Coons führte bereits 1954 auch eine indirekte Technik ein (Weller and Coons 1954).

Enzyme

Als Antikörperlabel dienen bei diesen Verfahren beispielsweise *Peroxidase* aus der Wurzel des Meerrettich (Avrameas 1969; Avrameas and Uriel 1966; Nakane and Pierce 1967), *Glukoseoxidase* aus *Aspergillus niger* (Clark, Down, and Primus 1982; Kuhlmann and Avrameas 1971), *Beta-Galaktosidase* aus *E. coli*, *Biotin-Avidin* (Guesdon, Ternynck, and Avrameas 1979) oder *Alkalische Phosphatase* aus Kälberdarm (Cordell et al. 1984; Mason et al. 1969).

Meerrettich-Peroxidase

Die Periode der Immunperoxidasetechniken beginnt 1966/67 damit, daß sowohl Avrameas und Uriel (1966) als auch Nakane und Pierce (1967) unabhängig voneinander das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase= HRP) als Markersubstanz anstelle von Fluorochromen inaugurieren.

Die Meerrettichperoxidase (HRP) ist ein Chromoprotein aus der Gruppe der Oxidoreduktasen (MG ca. 40.000 D) mit Fe^{III} in Häm-Bindung (Hämatin) als prosthetische Gruppe (Neumüller 1973). Das Enzym reagiert mit seinem spezifischem Substrat H₂O₂ und oxidiert dabei seine hämoprosthetische Gruppe. Es entsteht zunächst ein Primärkomplex aus HRP und H₂O₂. Bei Anwesenheit eines Elektronendonors bildet sich ein zweiter Komplex, wobei ein Charge-Transfer von der hämoprosthetischen Gruppe zum Peroxid stattfindet, das damit zu Wasser reduziert wird. Im dritten Schritt wird substratunabhängig der Donor oxidiert, die HRP wird regeneriert und der Komplex dissoziiert (Sternberger 1979). Als Elektronen-Donoren können u.a. die in Tabelle 2.3-2 aufgeführten Chromogene, meist Amine, eingesetzt werden:

Als häufigste Chromogene für die HRP haben sich DAB und AEC durchgesetzt, wobei DAB im Gegensatz zu AEC unlöslich in organischen Lösungsmitteln ist.

Da DAB nach seiner Oxidation polymerisiert, kann die Reaktion mit Hilfe von Imidazol und/oder nachfolgender Zugabe von Goldchlorid mit Silbersulfit, Osmiumtetroxid, Tyramiden, NiCl₂, CoCl₂ oder CuSO₄ verstärkt werden (De Jong et al. 1985; Hsu and Soban 1982; Hunyady et al. 1996; Johansson and Backmann 1983; Sternberger 1979; Trojanowski, Obrocka, and Lee 1983).

Tabelle 2.3-2
Chromogene für die Meerrettichperoxidase

<i>Chromogene</i>	<i>Farbe des Reaktionsproduktes</i>
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) (Graham and Karnovsky 1966)	braun
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) (Graham, Lundholm, and Karnovsky 1965)	rot
Tetramethyl-Benzidin (TMB) (Mesulam 1982)	blau
3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin (TMB) (Mesulam, 1982)	braun
4-Chloro-1-Naphthol (CN) (Nakane 1968)	blau-violett
m-Phenylendiamin (MPD) (Porstmann, Porstmann, and Nugel 1981)	braun
o-Phenylendiamine (OPD) (Porstmann, Porstmann, and Nugel 1981)	braun
p-Phenylendiamin-Pyrokatechol (HYR, Hanker-Yates-Reagenz) (Hanker, Yates, and Matz 1977)	blauschwarz
2,2-Azinodi(ethylbenzthiazoline)sulfonat	grün

Alkalische Phosphatase

Ein weiteres oft eingesetztes Markerenzym ist die Alkalische Phosphatase (AP). Alkalische Phosphatasen (Orthophosphor-mono-ester-phosphohydrolase) sind Zink enthaltende Hydrolasen mit MG zwischen 100 und 200 kD, die Phosphorsäureester unter alkalischen Bedingungen (pH 8) hydrolysieren, indem sie P-O-Bindungen aufbrechen (Neumüller 1973). Als Substrate für die AP eignen sich organische Phosphate wie 4-Nitrophenylphosphat, Naphtol-Anilid-Säure-phosphate und dergleichen, wobei nach Abspaltung des Phosphatrests das Substrat mit einem stabilisierten Diazoniumsalz zu einem wasserunlöslichem Azofarbstoff gekoppelt wird (Bergmayer 1974; Fernley 1971). Zur Koppelung können verschiedene Diazoniumsalze benutzt werden (Tabelle 2.3-3).

Glukoseoxidase (GOX)

Glukoseoxidase ist ein Enzym des Pilzes *Aspergillus niger*, das in Säugetiergeweben nicht vorkommt (Clark, Down, and Primus 1982; Kuhlmann and Avrameas 1971). Als Chromogene für die GOX werden Tetrazoliumsalze (blau) mit Phenazin-Methosulfat als Elektronendonator eingesetzt (Clark, Down, and Primus 1982; Suffin, Muck, and Young 1979). Immunhistochemische Verfahren mit

Tabelle 2.3-3
Substrate und Chromogene für die Alkalische Phosphatase

Substrat	Chromogen	Farbe
Naphtol AS-BI - Phosphat	Fastred (Ponder and Wilkinson 1981)	rot
	Neufuchsin (Cordell et al. 1984)	rot
Naphtol AS-MX - Phosphat	Fastblue (Mason and Sammons 1978)	blau
	Fastred (Cordell et al. 1984)	rot
	Variaminblau (De Jong et al. 1985)	blau-violett
Naphtol AS-Phosphat	Fastred-Violett (Yam, Khansur, and Tavassoli 1988)	rot-violett
	Fastblue (Janckila, Yam, and Li 1985)	blau
Naphtol AS-GR - Phosphat	Variaminblau (Fritz et al. 1985)	blaugrün
Naphtol AS-TR-Phosphat	Neufuchsin (Malik and Daymon 1982)	rot
Nitroblau-Tetrazolium	5-Bromo-4-Chlorid-3-Indoyl-Phosphat (De Jong et al. 1985)	dunkelblau
Tetra-Nitroblau-Tetrazolium	5-Bromo-4-Chlorid-3-Indoyl-Phosphat (De Jong et al. 1985)	schwarz
Menadiol-Diphosphat	Fastred, Fastblue (Dikow, Gossrau, and Frank 1990)	rot, blau

GOX haben sich allerdings nicht durchgesetzt, da sie nur mit hohen Antikörperkonzentrationen arbeiten; allenfalls für Doppelfärbungen wird die Immunkomplexmethode Glukoseoxidase-anti-Glukoseoxidase mitverwendet (Clark, Down, and Primus 1982).

Avidin-Biotin-Systeme

Die Avidin-Biotin-Systeme wurden von Guesdon et al. (1979) eingeführt. Grundlage ist die außergewöhnliche hohe Affinität zwischen dem Glykoprotein Avidin (MG ca. 68.000 D), das im Eiweiß des Hühnereis gefunden wird, oder dem Streptavidin aus *Streptomyces avidinii*, ein tetrameres Avidinanalogen mit einem Molekulargewicht von 60.000 D (Cartun and Pedersen 1989; Shi et al. 1992), einerseits und Biotin (MG ca. 244 D; =Vitamin H; =Coenzym R) andererseits. Avidin bzw. Streptavidin vermag vier Moleküle Biotin physikalisch mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-15} l/Mol (Green 1975) zu binden. Biotin kann chemisch schonend (Guesdon, Ternynck, and Avrameas 1979) an verschiedene Proteine konjugiert werden: an Enzyme, Lektine, ans Fc-Fragment von Immunglobulinen usw. Weiterhin kann Avidin schonend mit Peroxidase oder Alkalischer Phosphatase gekoppelt werden. Die Visualisierung eines Antigens erfolgt somit nichtimmunologisch über die Bindung von Biotin mit Avidin. Weit verbreitet sind die ABC-Methode („avidin-biotin-complex“), die mit einem freien Avidin-Biotin-Komplex arbeitet (siehe auch Seite 78 ff.) und die LAB-Technik („labeled avidin-biotin-technique“), bei der ein biotinierter Sekundärantikörper und peroxidase bzw. phosphatase-markiertes Avidin zur Visualisierung benutzt wird.

Dextranpolymer-Techniken

Eine anderen Weg gehen die Dextranpolymer-Techniken: Basierend auf einem wasserlöslichen Dextranpolymer, an das bis zu 100 Markerenzyme (Peroxidase oder Alkalische Phosphatase) gekoppelt sind (Abbildung 2.3-5), werden erheblich mehr Visualisierungssignale pro Antigen möglich als bei den „klassischen“ Techniken (Chilosi et al. 1994; Heras, Roach, and Key 1995). Da zudem das Dextranpolymer weniger unspezifische Bindungen einnimmt, sind diese Methoden deutlich sensitiver. Dextrantechniken werden zur Zeit nur von einem Hersteller angeboten und können als direkte und indirekte Methoden eingesetzt werden. Bei der direkten Methode sind zusätzlich primäre Antikörper an das Dextranpolymer gekoppelt.

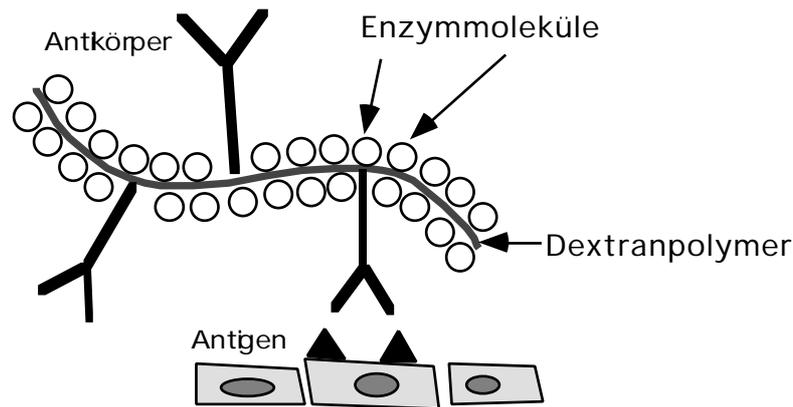


Abbildung 2.3-5

Prinzip der Dextran-Technik: Ein Dextranpolymer, an das Enzymmoleküle und Primärantikörper gekoppelt sind, bindet über den Primärantikörper das Antigen.

Immunfärbetechniken

Alle immunhistochemischen Techniken haben letztendlich zum Ziel, mit möglichst wenig Unspezifität ein Maximum an Antigen zu detektieren. Die zur Zeit wichtigsten Detektionssysteme werden nachfolgend besprochen.

Immunfluoreszenz (IF)

Die IF ist eine „labeled method“ und wird in der Regel als direkte oder als indirekte Zweischrittmethod angewendet. Eingesetzt wird die IF allerdings auch sequentiell, mit Doppelmarkierungen oder in der sogenannten Hapten-Sandwich-Methode (siehe dazu auch: Kawamura 1969; Sternberger 1979).

Die Vorteile der Immunfluoreszenz liegen in der hohen Auflösung und der relativ schnellen Durchführbarkeit. Die Nachteile liegen im apparativen Aufwand (Fluoreszenzmikroskop mit Quecksilber-Hochdrucklampe, abdunkelbare Räume), schlechter Darstellung der Morphologie trotz möglicher Gegenfärbungen mit Methyl-Grün, Evan's Blue, mit Lissamin-Rhodamin versetztes Rinderalbumin oder Hoechst Dye (Schenk and Charukian 1974), der schlechteren Asservierbarkeit und der nur mit Einschränkung an formalin-fixierten Paraffinmaterial vornehmbaren Untersuchung.

Die Enzym-Komplex- und die Avidin-Biotin-Verfahren haben zwar eine geringere Auflösung als die IF, sind aber in der Regel sensitiver (De Jong et al. 1985). Außerdem kann formalin-fixiertes Paraffinmaterial, das gerade bei retrospektiven Untersuchungen das Hauptmaterial darstellt, verwendet werden. Darüber hinaus sind die gefärbten Präparate mit normalen Lichtmikroskopen auswertbar, über Jahre hinweg archivierbar und stellen, da mit Hämalaun oder Hämatoxilin gegen-

gefärbt werden kann, die Morphologie in für Pathologen „gewohnter“ Art und Weise dar.

Die Peroxidase anti-Peroxidase-Methode (PAP)

Die älteste unkonjugierte Methode ist das Enzym-Komplex-Verfahren Peroxidase anti-Peroxidase (PAP), das durch Sternberger et al. (1970) eingeführt wurde. Der äußerst stabile PAP-Komplex besteht wahrscheinlich aus drei Peroxidasemolekülen und zwei Antiperoxidase-Antikörper, die über einen Brückenantikörper mit dem Primärantikörper verbunden werden (Abbildung 2.3-6).

Die PAP-Methode ist allerdings besonders empfindlich für den „**Bigbee**“-Effekt: Hohe Antigenkonzentration im untersuchten Gewebe oder zu hohe Primärantikörperkonzentrationen verursachen falsch negative Färbeargebnisse (Bigbee, Kossek, and Eng 1977): Wenn zu viele Primärantikörper mit einer Valenz an das Gewebeantigen gebunden werden, können die freien Valenzen der Primärantikörper stöchiometrisch die Brückenantikörper vollständig besetzen, so daß dieser keine

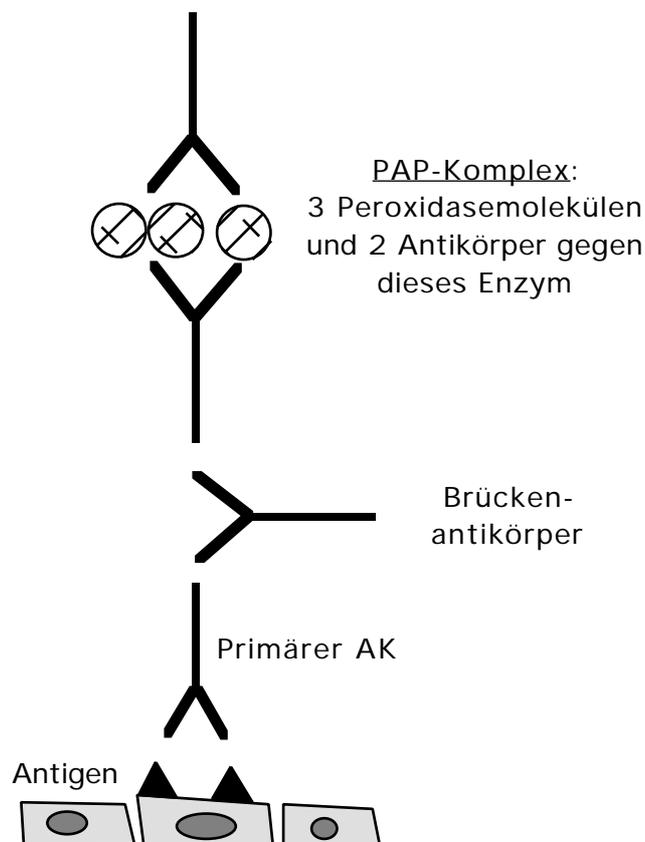


Abbildung 2.3-6

PAP-Methode: Primärantikörper und anti-Peroxidase-Antikörper stammen aus einer Tierart; der Brückenantikörper ist spezifisch gegen Immunglobuline dieser Spezies gerichtet und verbindet somit beide. Die Bindung wird durch Reaktion der Peroxidase mit einer Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht.

Bindungskapazität für die anti-Peroxidase-Antikörper hat. Beziehungsweise: bei zu vielen Primärantikörpern (im Vergleich zum Antigen) können sich diese bei der Antigenerkennung gegenseitig sterisch behindern.

Die Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase-Methode (APAAP)

Bereits Avrameas und Mitarbeiter (1969; 1966) versuchten eine direkte Kopplung von Alkalischer Phosphatase (AP) an Antikörper zu erreichen, erzielten allerdings nur eine sehr geringe Spezifität. Mason und Sammons (1978) setzten eine Zweischriftmethode ein, um doppelte immunenzymatische Markierung gemeinsam mit der PAP-Methode zu ermöglichen. Sie verwendeten dabei polyklonale Ziegen- und Kaninchenantikörper.

Erst mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen die Alkalische Phosphatase (Cordell et al. 1984) wurde es möglich, die Alkalische Phosphatase in löslichen Enzymkomplexen zur Detektion von monoklonalen Primärantikörpern einzusetzen. Jetzt erst gelang es monoklonale Primärantikörper über einen anti-Maus-Brückenantikörper mit dem monoklonalen APAAP-Komplex (Komplex aus AP aus Kälberdarm und anti-AP-Antikörper aus der Maus) zu verbinden. Bedingt durch die hohe Spezifität und damit Selektivität der anti-AP-Immunglobuline, entstehen APAAP-Komplexe hoher Reinheit. Den schematischen Ablauf der

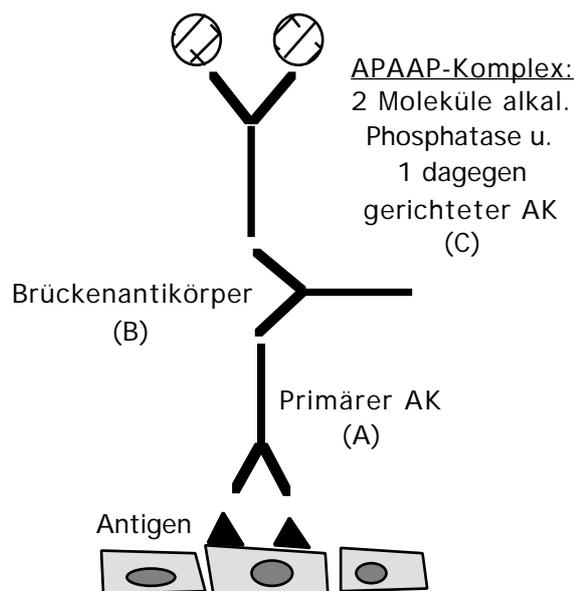


Abbildung 2.3-7

APAAP-Methode:

- A) Das Gewebeantigen wird durch den unlabelled monoklonalen Primärantikörper gebunden.
- B) Der unmarkierte Brückenantikörper (Kaninchen anti-Maus-Antikörper) wird zugegeben.
- C) Im letzten Schritt wird der APAAP-Komplex zugegeben. Der Brückenantikörper muß im Überschuß zugegeben werden, so daß eines seiner Fab-Fragmente den Primärantikörper und das andere den APAAP-Komplex bindet.

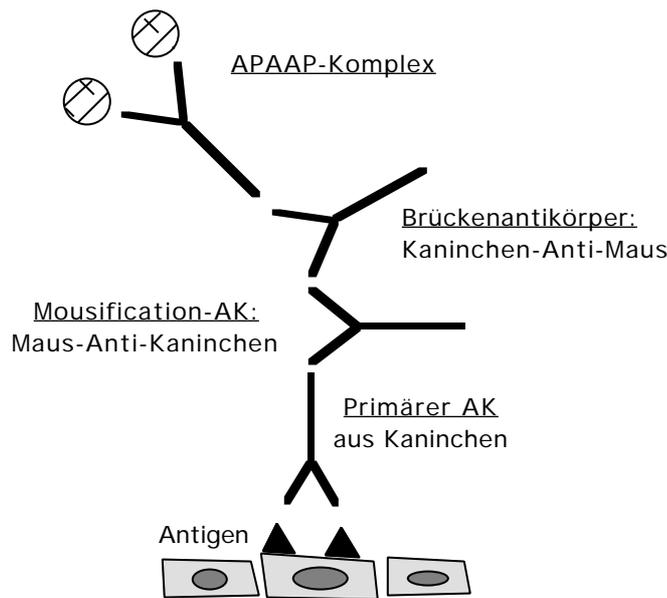


Abbildung 2.3-8
Prinzip der „Mousification“ bei der APAAP: Der Primärantikörper aus Kaninchen wird durch einen Maus anti-Kaninchen-Antikörper für den Brückenantikörper (Kaninchen anti-Maus) „erkennbar“.

APAAP-Methode zeigt Abbildung 2.3-7. Zur Verstärkung der Reaktion können Brückenantikörper und APAAP-Komplex wiederholt aufgetragen werden.

Werden allerdings polyklonale Primärantikörper eingesetzt (z.B. Kaninchen-IgG), muß nach der Inkubation des Primärantikörpers ein Zwischenschritt eingeführt werden: die „Mousification“. Dabei wird ein Maus-Antikörper, der gegen Immunglobuline des Primärantikörpers gerichtet ist (beim Beispiel: Maus anti-Kaninchen), benutzt. Abbildung 2.3-8 verdeutlicht den Vorgang der „Mousification“. Diese Modifikation ist ohne Verlust der Sensitivität durchführbar.

Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode)

Die Avidin-Biotin-Complex Methode (Hsu, Raine, and Fanger 1981a; Hsu, Raine, and Fanger 1981b) ist eine der am häufigsten eingesetzten indirekten Methoden. Sie ist erheblich sensitiver als die ursprünglich von Guesdon et al. (1979) vorgestellte Biotin-Avidin-Methode und wird meist als indirekte Brückentechnik angewendet. Dabei dient ein biotinielter Sekundärantikörper als Brücke zwischen dem Primärantikörper und einem Komplex aus Avidin und biotiniertem Enzym (Abbildung 2.3-9). Die besten Färbeergebnisse werden mit einem Avidin:Biotinenzymkonjugat-Verhältnis von 4:1 erzielt, wie es die meisten kommerziellen Färbekits enthalten. Als Enzymlabel des final zugesetzten Biotins werden hauptsächlich Meerrettichperoxidase, aber auch Alkalische Phosphatase eingesetzt.

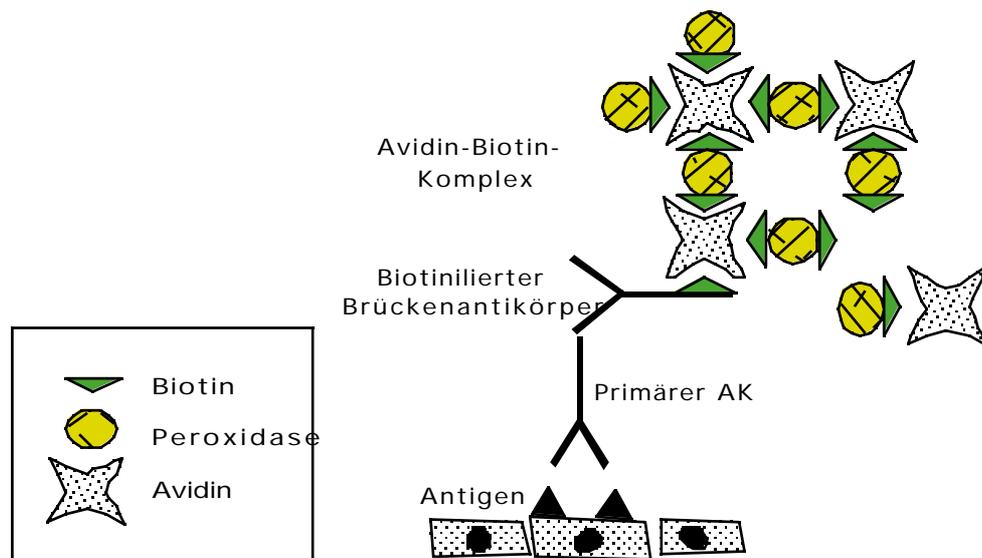


Abbildung 2.3-9

ABC-Methode: Nach Inkubation des Primärantikörpers, wird zunächst ein biotinylierter Sekundärantikörper und schließlich ein Gemisch aus Avidin sowie Biotin-Enzymkonjugate zugesetzt. Der primäre Antikörper ist unkonjugiert; nach seiner Bindung ans Antigen wird er mit Hilfe eines gegen den Primärantikörper gerichteten biotinylierten Brückenantikörpers mit einem Komplex aus Avidin und Biotin-Enzym verbunden.

Eine zusätzliche Optimierung bietet die ABC-Methode in ihrer Variante Streptavidin-Biotin-Complex Methode: Durch Ersatz des Avidins durch Streptavidin, ein tetrameres 60.000 D schweres Avidinanalogen aus *Streptomyces avidinii*, das direkt mit Peroxidase oder Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (LAB: Labeled Avidin-Biotin) werden viele der Probleme mit unspezifischer Färbung der Originalmethode umgangen (Cartun and Pedersen 1989): Dadurch daß Streptavidin im Gegensatz zum Avidin keine Kohlenhydratreste enthält, die an lektinartige Gewebesubstanzen binden, werden unspezifische Färbungen vermieden.

Eine nochmalige Steigerung der Sensitivität läßt sich durch eine Kombination der ABC-Methode mit der Immunperoxidase-Technik erzielen (Bobrow et al. 1989) – die sogenannte CSA-Methode (Catalyzed Signal Amplification): Nach Applikation einer normalen ABC-Methode wird ein biotinyliertes Phenol (z.B. Tyramin) zugegeben, das mit der gebundenen Peroxidase reagiert und so die Anzahl reaktiver Biotin-Moleküle vergrößert. Abschließend wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, das an die freien Biotin-Moleküle bindet und nach Zugabe von DAB/H₂O₂-Substrat visualisiert wird.

Enhanced Polymer One-Step Staining (EPOS) und EnVision™-System

Die EPOS-Technik ist ein relativ neues Verfahren, das bereits als direkte Technik Ergebnisse bringt, die den der ABC- oder APAAP-Methoden mindestens entspricht (Bobrow et al. 1989; Rott and Velkavrh 1997). Das zu untersuchende Gewebe wird direkt mit einem Dextranpolymerkonjugat inkubiert. An das Dextrangrundgerüst sind neben den primären Antikörpern auch die Enzymmoleküle (HRP oder AP) gekoppelt. Da das Dextranpolymer bis zu 500 Enzymmoleküle und etwa 10-50 Antikörper enthält, ergibt sich bereits dadurch ein hochempfindliches Konjugat. Nachteil ist jedoch, daß bisherige Antikörper nicht mehr eingesetzt werden können (Tsutsumi, Serizawa, and Kawai 1995).

In Erweiterung dieser Technik wurde ein Zweischritt-System (EnVision™, Dako GmbH, Hamburg) eingeführt (Heras, Roach, and Key 1995; Van der Loos, Naruko, and Becker 1996), das wie herkömmliche indirekte Methoden eingesetzt wird: Nach Inkubation des Gewebes mit dem spezifischen Antikörper, wird ein Dextranpolymerkonjugat zugegeben. Dabei sind an dieses Dextrangerüst sowohl die Sekundärantikörper (Anti-Maus- **und** Anti-Kaninchen-Antikörper) als auch die Enzymmoleküle (HRP oder AP) gekoppelt. Vorteile dabei sind, daß herkömmliche Antikörper weiter verwendet werden können und zwar sowohl mono- als auch polyklonale Antikörper.

Methodik und Rahmenbedingungen der Immunhistochemie

So einfach die Methoden sind, müssen doch einige Rahmenbedingungen beachtet werden, um Hintergrundreaktivitäten, falsch positive und/oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Davon handeln die nächsten Abschnitte.

Gewebebehandlung für die Immun - histochemie

Gewebefixation

Zur optimalen Darstellung von morphologischen Details und einer immunhistochemischen Reaktivität, müssen die zu untersuchenden Proben optimal fixiert werden (Brandtzaeg 1982).

“Fixieren. . . . bedeutet die Unterbrechung und Festlegung (nach Art einer Momentaufnahme) der komplexen intra- und supravitalen Stoffwechselprozesse, der Strukturen, die sie ermöglichen, und die Verhinderung der postmortalen Zerfallerscheinungen” (Böck 1989).

Gefrierschnitte

Ursprünglich beruhen alle immunhistochemischen Techniken auf dem Einsatz von meist unfixierten Gefrierschnitten, in denen die Antigenität des Untersuchungsmaterials nicht durch Fixierung und Einbettung beeinträchtigt ist. Die zu untersuchende Probe soll dabei schnell und schonend tiefgefroren werden, eventuell durch Gefriersubstitution fixiert und dann am Kryostaten geschnitten werden. Vorteile der Gefrierschnitttechnik bringen neben dem Antigenitätserhalt, die Schnelligkeit des Verfahrens. Allerdings gibt es auch eine Vielzahl von Gründen, die den Einsatz von nativen Gefrierschnitten fraglich oder unmöglich machen: Retrospektive Untersuchungen beispielsweise sind meist von formalinfixiertem und paraffineingebettetem Material abhängig. Weiterhin ist die lichtmikroskopische Feinauflösung von Gefrierschnitten oft erheblich schlechter als bei fixiertem Material. Dazu kommt, daß lösliche Antigene während des Gefriervorganges in die Umgebung diffundieren können, und dann falsch lokalisiert und nicht mehr nachgewiesen werden können. Das wird vor allem bei intranukleären und intrazytoplasmatischen Antigenen mit niedrigem Molekulargewicht (Brandtzaeg 1982; Riederer et al. 1993; Taylor and Shi 1994) aber auch bei S-100-Protein (eigene Beobachtung) gesehen. Ferner bleiben endogene Fc-Rezeptoren und endogenes Biotin durch den Gefriervorgang erhalten, an die die eingesetzten Antikörper bzw. Avidin-Komplexe binden und falsch positive Ergebnisse verursachen (Itoh, Miura, and Suzuki 1977; Taylor and Shi 1994).

Trotzdem bleiben Gefrierschnitte für den Nachweis einer Vielzahl von Antigenen, wie zum Beispiel für bestimmte Zytokeratine oder für bestimmte CD-Antigene,

weiterhin *conditio sine quam non*. Um allerdings der Ausbildung von Eiskristallen und dem Leidenfrostschen Phänomen vorzubeugen, sollten die Proben sofort nach Entnahme in einer Kühlflüssigkeit wie Isopentan oder Freon in flüssigem Stickstoff schocktiefgefroren werden (Johnson, Holborow, and Dorling 1978). Um die Morphologie möglichst optimal am Gefrierschnitt darzustellen, ist eine Fixierung oftmals nicht zu umgehen. Dabei empfiehlt sich die von Stein et al. (1985) vorgeschlagene Methode: Nach einer 5-10 minütigen Fixierung in kaltem Aceton werden mit dem Kryostaten übliche Schnitte angefertigt, die bei Raumtemperatur 10 min. in Aceton weiterfixiert werden und vor dem Färben mindestens 2 Stunden luftgetrocknet werden. Optimal soll eine Art Gefrier-trocknung der Gewebe bei $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 10^{-2} torr zur Fixation labiler Oberflächen-antigene sein, die sich wegen des apparativen Aufwands allerdings nicht durchsetzen konnte (Stein et al. 1984; Stein et al. 1985)

Formaldehydfixierung

Formaldehyd wurde bereits 1893 (Blum 1893) als Fixierungsmittel für Gewebe eingeführt. Formaldehyd (HCHO) ist ein flüchtiges Gas, das wassergelöst als 37 % bis 40 % w/v Formalin kommerziell erhältlich ist. Üblicherweise wird davon eine 10%ige Verdünnung hergestellt, die entsprechend 4 % Formaldehyd enthält. Formaldehyd polymerisiert in wässriger Lösung leicht zu Polyoxymethylen und wird spontan zu Ameisensäure oxidiert. Durch Neutralisation mit Kalziumkarbonat oder Einmischung eines Phosphatpuffers wird das Formalin auf $\text{pH} = 7,0$ eingestellt und damit die Oxidation weitgehend vermindert. Bei neutralem pH enthält die Lösung überwiegend Methylenglycol [$\text{HCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_2(\text{OH})_2$]. Formalin entfaltet seine konservierende Wirkung hauptsächlich über Reaktionen mit basischen Aminosäuren in Proteinen, die in Quervernetzungen innerhalb und zwischen Polypeptidketten enden: Methylenglycol penetriert leicht ins Gewebe, bindet sich an Proteine und wird zu Formaldehyd dehydriert. Formaldehyd reagiert direkt mit Polypeptidketten und führt zur Ausbildung von methylenartigen Quervernetzungen zwischen Amido- und Aminogruppen, alkoholischen Hydroxylgruppen und aromatischen Ringstrukturen. Disulfidreste werden zu Sulfhydrylgruppen reduziert, die wiederum unter Einwirkung von Formaldehyd quervernetzende Methylenbindungen ausbilden (Baker 1958; Fox et al. 1985; Mason and O'Leary 1991). Der Vorteil der Formalinfixierung ist, daß Sekundärstrukturen weitgehend erhalten bleiben (Mason and O'Leary 1991). Allerdings werden bestimmte Epitope nach der Formalinbehandlung von einigen Antikörpern nicht mehr erkannt. Dies ist auch eine Funktion der zeitlichen Einwirkung von Formalin: Je länger ($> 24\text{ h}$), desto schlechter die Immunreaktivität (Leong and Gilham 1989). Dieser Vorgang ist allerdings zumindest teilweise wieder re-

versibel, da viele Antigene durch die Methylenbrücken nicht zerstört, sondern lediglich für den Antikörper „maskiert“ werden.

Mikrowellenfixierung

Über Mikrowellenbehandlung zur Gewebefixierung in der Pathologie wurde bereits 1970 berichtet (Mayers 1970). Dabei kann Formalinbehandlung (0,5-1%ig) mit der Mikrowellenbestrahlung kombiniert werden (Kaysers, Lübcke, and Strauch 1987; Leong, Daymon, and Milios 1985). Allerdings können Mikrowellen Gewebe mit mehr als 4 cm Dicke nicht durchdringen; daher ist es notwendig, daß die zu behandelnden Gewebe nicht dicker als 3 cm sind, wobei Blöcke unter 1 cm Dicke am besten fixiert werden. Leong et al. (1988) verglichen die immunhistochemischen Färbungen von 23 Antigenen in formalinfixierten und mikrowellenbehandelten Geweben, und stellten mit Ausnahme von S-100 bei allen Antigenen eine Überlegenheit der Mikrowelle fest. Allerdings mußten Zytokeratine und Desmin weiterhin enzymvorbehandelt werden. Trotz dieser sehr positiv klingenden Ergebnisse sind weitere Studien nötig, um diese Methode zu standardisieren (Taylor and Shi 1994).

Weitere Fixationsmethoden

Neben den oben aufgeführten Methoden werden von verschiedenen Autoren weitere Fixierungstechniken vorgeschlagen: Außer der sogenannten AMEX-Methode (aceton-methyl benzoate-xylene), bei der die Proben in eiskaltem Azeton (bei -20 °C) fixieren (Sato et al. 1986), werden vereinzelt sublimathaltige Fixativa wie B5, eine Formalin und Quecksilberchlorid enthaltende Lösung, oder Zenkersche Lösung eingesetzt (Taylor and Shi 1994). Für den Nachweis spezifischer Antigene werden darüber hinaus pikrinsäurehaltige Reagentien vorgeschlagen: Z.B. gelten Bouin'sche Lösung, deren Modifikationen aber auch das Carnoysche Gemisch (Alkohol-Eisessig-Chloroform) als überlegen für den Nachweis von Neuropeptiden und biogenen Aminen (Miller 1972; Somogyi and Takagi 1982).

Die in der Frühzeit der Immunhistochemie oft eingesetzte Fixierung in kaltem Ethanol (Sainte-Marie 1962), konnte sich wegen dem schlechten Erhalt der Morphologie nicht durchsetzen.

Entkalkung

Etlliche Untersuchungen bestätigen, daß Entkalkungslösungen, die neutrales EDTA, 10%ige Ameisensäure und 10%ige azidische Säure sogar nach 7 wöchiger Entkalkung die Immunreaktivität kaum beeinträchtigen (Athanasou et al. 1987; Matthews and Mason 1984; Mukai, Yoshimura, and Anzai 1986).

„Demaskieren“ formalinfixierter Proben

Die unterschiedlichen Arten der Vorbehandlung formalinfixierter Schnitte zielen darauf, maskierte Epitope durch Dissoziation der Methylenbrücken Antikörpern wieder zugänglich zu machen.

Enzymatische Vorbehandlung

Mit als Erste konnten Huang et al. (1976) zeigen, daß enzymatische Vorbehandlungen in der Lage sind, maskierte Epitope freizulegen. Üblicherweise werden Pepsin, Ficin, Trypsin und/oder Pronase zum Vorverdauen eingesetzt.

Pepsin (MG 34.500) gehört seiner Wirkung nach zu den Peptidylpeptidhydrolasen (Endopeptidasen) und spaltet zentrale Peptidbindungen in Proteinen und Peptiden bei L-Konfiguration beiderseits der Spaltstellen. Bezüglich der Aminosäurenreste werden unspezifisch aromatische Reste (Phenylalanin, Tyrosin) bevorzugt. In vivo wird diese Protease in Form seines inaktiven Proenzym Pepsinogen von den Hauptzellen der Magenmukosa synthetisiert und intrazellulär als Zymogengranula gespeichert. Sein Temperaturoptimum liegt bei 37 °C, sein pH-Optimum zwischen 1,5 und 2,0 (Neumüller 1973).

Ficin ist eine Hydrolase mit für die Immunhistochemie milden digestiven Eigenschaften, die ursprünglich aus südamerikanischen Ficus-Arten (Feigen) gewonnen wurde, üblicherweise in der Lebensmittelindustrie (Bierherstellung; nicht in Deutschland!) eingesetzt wird und deren Wirkungsoptimum bei pH 5,0 bis 5,5 liegt (Kortt, Hinds, and Zerner 1974).

Trypsin wird in vivo im Duodenum aus Trypsinogen durch Aktivierung mit Ca²⁺ und einer Enteropeptidase (Enterokinase) oder durch Autokatalyse gebildet. Als Endopeptidase spaltet Trypsin bevorzugt an der Carboxylseite von Lysin- und Argininresten. Sein Wirkungsoptimum liegt bei pH = 7-9 und 37 °C (Neumüller 1973).

Als *Pronase* werden Staphylococcus-Proteasen bezeichnet, die bevorzugt an der Carboxylseite von Aspartat- und Glutamatresten Proteine spalten.

Die Dauer und die Konzentration der Enzyme hängt von vielen Faktoren ab: Neben der Dauer der Fixierung (je länger fixiert, desto länger Verdauen), ist die Art des Antigens, des Antikörpers und letztendlich auch die Herstellungscharge des Enzyms entscheidend und muß in jedem Fall neu ausgetestet werden (Battifora and Kopinski 1986; Cattoretti et al. 1993).

Antigen-Retrieval-Systeme

Bereits Fraenkel-Conrat et al. (1947) und Fraenkel-Conrat und Olcott (1948) konnten zeigen, daß die formalintypische Proteinquervernetzung bei Temperaturen um 120 °C oder in Anwesenheit hoher Alkalikonzentrationen verändert wird. Darüber hinaus berichteten Banks et al. (1979), daß Entparaffinieren und Refixieren in Zink-Formalin verbesserte immunhistochemische Färbungen ergibt. Auch alkalische Hydrolyse in NaOH (Shi et al. 1992) oder Vorbehandlung mit Ameisensäure (Kitamoto et al. 1987) sollen die Quervernetzungen aufheben.

Das führte einerseits zu der Entwicklung sogenannter Antigen-Retrieval-Methoden, bei denen formalinfixierte Schnitte in bestimmten (Metall-)Salzlösungen erhitzt werden (Boon and Kok 1989)(Boon and Kok 1989), um maskierte Epitope freizulegen. Darüber hinaus bieten verschiedene Firmen sogenannte „Antigen-Retrieval-Lösungen“ oder „Enhancer“ an, die meistens aus Metallsalzlösungen bestehen und mit und ohne Erhitzen eingesetzt werden können.

Sowohl Cattoretti et al. (1993) als auch Pileri et al. (1997) konnten allerdings zeigen, daß die Darstellung maskierter Epitope auch von den verwendeten Antikörpern abhängt: Somit sind antikörperabhängig entweder enzymatische und/oder hitzevermittelte Vorbehandlungen mit unterschiedlichen Lösungen (Metallsalzlösungen, organische und karboxylhaltige Lösungen) notwendig, um eine optimale Antigendarstellung am formalinfixierten und paraffineingebetteten Material zu ermöglichen.

Mikrowellenvorbehandlung

Die Mikrowellenvorbehandlung formalinfixierter Proben ermöglicht in sehr vielen Fällen die Demaskierung unterschiedlicher Antigen (Cattoretti et al. 1993; Cattoretti and Suurmeijer 1995; Pileri et al. 1997; Shi et al. 1992; Shi, Key, and Kalra 1991). Die durch die Mikrowelleneinstrahlung induzierte Beschleunigung der Molekularbewegung der Wassermoleküle führt bei stochastischen Zusammenstößen mit benachbarten Molekülen zu einer Übertragung der Rotationsenergie, die in Wärme umgewandelt wird (Boon and Kok 1989; Cattoretti and Suurmeijer 1995). Im Gegensatz zu üblichen Kochvorgängen, die einem großen Temperaturgradienten folgen, geschieht die Erwärmung bei der Mikrowellenbehandlung sehr schnell und gleichmäßig. In Anwesenheit von Salzen oder proteindenaturierenden Substanzen, ermöglicht die Gewebeerhitzung ein Aufbrechen quervernetzter Proteinstrukturen (Cattoretti et al. 1993; Pileri et al. 1997). Das steht im völligen Gegensatz zu den bisherigen Ansichten, daß Erhitzen zu einem Antigenverlust führe; zum Beispiel bei (Naish 1989). Wichtig bei der Mikrowellenbehandlung ist, daß die Schnitte nicht austrocknen dürfen. Das wird erreicht, indem die Schnitte in destilliertem Wasser oder unterschiedlichen Pufferlösungen

(1 mM EDTA–NaOH, 0,01 M Zitrat-, 0,1 M Tris-HCl-, gesättigter Harnstoff-Puffer) im Mikrowellenherd gekocht werden (Boon and Kok 1989; Cattoretti et al. 1993; Pileri et al. 1997). Cattoretti et al. (1993) und Pileri et al. (1997) haben in groß angelegten Studien unterschiedliche Puffersysteme und Antikörper untersucht und optimale Verbindungen festgestellt (Tabelle 2.3-4).

Tabelle 2.3-4

Optimale Vorbehandlungskombinationen für Immunhistochemie an formalinfixiertem Material; Auswahl aus: Cattoretti et al. (1993) und Pileri et al. (1997)

<i>Antikörper</i>	<i>Vorbehandlung</i>
Chromogranin A, Gastrin, Glukagon, Pankreatisches Polypeptide, Somatostatin	keine
IgG, Von Willebrand Faktor, Lysozyme	Enzyme
Vielzahl von CD-Antigenen, Desmin, GFAP, Neurofilament, NSE, MNF 116 (Zytokeratin); polyklonale IgA, IgM IgG, κ und λ light chains.	Mikrowelle mit Citratpuffer
α-smooth muscle Aktin, p53, S-100, Vimentin, Zytokeratine	Mikrowelle mit gesättigter Harnstofflösung
34βE12 (Zytokeratin), Lysozym, IgG, IgM	Mikrowelle mit Tris-HCl
MNF 116, 35βH11, Vimentin, Desmin, Neurofilament, Ki67, Thyreoglobulin	Mikrowelle mit EDTA - NaOH

Dampfdruckbehandlung

Die Wirksamkeit der Vorbehandlung formalinfixierter Schnitte mit unter Druck stehendem Dampf (Autoklave, Dampfkochtopf) beruht – ähnlich wie die Mikrowellenbehandlung – auf der schonenden und raschen Zufuhr von Wärme, die in der Lage ist, verdeckte Epitope durch Aufbrechen und Hydrolyse formalininduzierter Methylenbrücken frei zu machen, wobei als Retrieval-Lösungen die unter „Mikrowellenvorbehandlung“ genannten eingesetzt werden (Bankfalvi et al. 1994; Norton, Jordan, and Yeomans 1994; Pileri et al. 1997; Shi, Key, and Kalra 1991; Shin et al. 1991).

Letztendlich gibt es zwischen Mikrowellen- und Dampfdruckbehandlung nur minimale Qualitätsunterschiede, so daß die jeweilige Applikation (Mikrowelle oder Dampfdruck) eher von lokalen Gewohnheiten und Gegebenheiten abhängt (Pileri et al. 1997).

Objektträgervorbehandlung und Adhäsiva

Für optimale, reproduzierbare Ergebnisse sind auch die Objektträger zu optimieren. So ist es selbstverständlich, daß bei Einsatz der Immunfluoreszenz, Objektträger keine Eigenfluoreszenz aufweisen dürfen.

Bedingt durch die zum Teil rüden Vorbehandlungen (Proteolyse, Hitze), sowie durch die häufigen Wasch- und Inkubationsvorgänge im Ablauf einer immunhistochemischen Färbung, schwimmen Gewebeschnitte leicht von den Objektträgern (OT) ab. Um dies zu verhindern, sollten die OT mit Adhäsiva vorbehandelt werden. Die Tabelle 2.3-5 listet übliche Adhäsiva auf. Die Tabelle gibt die Reihenfolge der Eignung (unserer Erfahrung nach) wieder: Gelatine- und Eiweißpräparate haben die schlechtesten, Silane die besten Adhäsionseigenschaften.

Tabelle 2.3-5
Objektträger-Adhäsiva für die Immunhistochemie

<i>Adhäsivum</i>	<i>Quelle</i>
Chromalaun-Gelatine	(Pappas, 1971)
Eiweiß-Glyzerin	(Bourne, 1983)
Hühnerweißpräparationen	(Marhous, 1980)
Poly-L-Lysin	(Huang et al., 1983)
Elmar's Glue	(Bourne, 1983; Walter et al., 1988)
Pritt®-Kleber	(eigene Ergebnisse)
Silane	(Maples, 1985)

Gebrauchsverdünnung der Seren

Ziel der Färbung ist, bei optimaler Antigendarstellung geringste unspezifische Hintergrundfärbung zu erhalten. Für die meisten Antikörper werden Empfehlungen der Hersteller für bestimmte Färbemethoden mitgeteilt, die dann noch fein abgestimmt werden müssen. Die bei uns eingesetzte APAAP-Methode haben wir in einem Großversuch über Schachbrett-Titration soweit optimiert und standardisiert, daß wir lediglich die Verdünnung des Primärantikörpers einstellen müssen. In den meisten Fällen reicht es aus, von der Herstellerempfehlung ausgehend, die vorgehende und nachfolgende Verdünnungsstufe innerhalb einer geometrischen Folge auszutesten. Fehlen Herstellerangaben wird die optimale Verdünnung über Schachbrett-Titration festgelegt (Boenisch 1989a; Bourne 1983; Sternberger 1979; Taylor and Tandon 1994).

Zeiten, Temperaturen und pH

Die meisten angebotenen Testkits für unterschiedliche immunhistochemische Färbetechniken empfehlen 30-minütige Inkubationszeiten bei Raumtemperatur. Bei Färbetechniken, die leicht zu Hintergrundreaktivitäten führen wie beispielsweise die PAP- oder die ABC-Technik, empfiehlt sich eine verlängerte Inkubationszeit von 12-18 Stunden bei 4 °C (Taylor and Shi 1994; Walter, Dohse, and Rudolph 1989).

Unspezifische Färbung

Endogene Enzymaktivitäten können bei Enzym-Marker-Systemen Quellen unspezifischer Reaktionen sein. So sind von den Alkalischen Phosphatasen (AP) mehrere Isoenzyme bekannt, die in Darmmukosa, Niere, Knochen, Leber, Lunge, Muskulatur oder Pankreas angesiedelt sind (Fernley 1971; Milne and Doxey 1986; Moss 1974). Allerdings sind unterschiedliche Substanzen in Konzentrationen zwischen 10 mM und 100 mM in der Lage, zumindest nicht-intestinale AP zu hemmen: Levamisol, Glycin, Cystein, Methionin, EDTA, Alloxan, sowie CN^- , F^- und Cu^{++} (Bergmayer 1974; Borgers and Thone 1975; Cordell et al. 1984; Ponder and Wilkinson 1981). Am besten geeignet erscheint Levamisol, das in 1 mM Konzentration die nicht-intestinale AP vollständig hemmt, das intestinale Isoenzym allerdings nur unvollständig, wobei ein Absenken des pH unter 8,0 den Hemmeffekt verstärkt (Cordell et al. 1984; Ponder and Wilkinson 1981).

Probleme bei den Avidin-Biotin-Methoden bereiten endogene Peroxidasen, die Pseudoperoxidasereaktivität von Hämoglobin (Straus 1980; Streefkerk 1972) sowie unspezifische nichtimmunologische Bindungsphänomene des Avidin, wie zum Beispiel die Bindung an Plasma- und/oder Mastzellen sowie an endogen vorhandenes Biotin (Bolon, Calderwood, and Mays 1988; Bussolati and Gugliotta 1983; Denk 1986; Schauer 1992; Straus 1980; Taylor 1983; Tharp et al. 1985; Wood and Warnke 1981).

Präinkubation mit H_2O_2 in Methanol kann endogene Peroxidasen (Straus 1971) und die Pseudoperoxidase-Aktivität von Hämoglobin (Streefkerk 1972) hemmen, Präinkubation mit Avidin und Biotin verhindert die Bindung des Avidin-Peroxidase-Komplexes an endogenes Biotin (Wood and Warnke 1981). Die Zugabe von 0,01 M Imidazol hemmt die Pseudoperoxidase-Aktivität des Hämoglobins und verstärkt zusätzlich die Oxidationsrate des DAB (Straus 1980). Sogenannte ex- oder intrinsische Pigmente wie Formalinpigment, Sublimatniederschläge, Melanin, Hämosiderin oder Gallenpigment können unter Umständen als positive Reaktionen fehlinterpretiert werden (Walter, Dohse, and Rudolph 1989).

Speziell bei polyklonalen Antikörpern kann eine zum Teil hochgradige unspezifische Hintergrundreaktivität beobachtet werden. Ursachen sind häufig unspezifische Bindungen von Serumbestandteilen mit Gewebestrukturen infolge von elektrostatischen und/oder hydrophoben/hydrophilen Wechselwirkungen (z.B. an Kollagene oder lektinartige Membranbestandteile). Durch Präinkubation mit nichtimmunogenem Serum und/oder durch Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer kann versucht werden, dies zu verhindern (Taylor and Tandon 1994; Wood and Warnke 1981).

In Gefrierschnitten können durch die Diffusion löslicher Antigene falsch lokalisierte oder negative Ergebnisse (Wachsmuth 1976) und durch den Erhalt von Fc-Rezeptoren in der Probe falsch positive Ergebnisse erzielt werden (Itoh, Miura, and Suzuki 1977).

Weitere Quellen unspezifischer Färbungen sind Anwesenheit von Triton X-100 im Puffer (Satoh et al. 1992), Kontaminationen der Primär- und Sekundärantikörper sowie ungewollte Kreuzreaktionen. Zum Teil können auch mitotische Zellen und nekrotisches Gewebe Antikörper absorbieren und so zu falsch positiven Reaktionen führen (Leong 1993; Pelstring et al. 1991).

Kontrollen

Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse auszuschließen, sind immunologische und methodische Kontrollen, die bei jedem neuen Ansatz mitgeführt werden müssen, eine *conditio sine qua non* (Bourne 1983; Leong 1993; Naish 1989; Taylor and Tandon 1994; Walter, Dohse, and Rudolph 1989).

Als Positivkontrolle wird eine mit der zu untersuchenden Probe gleichartig vorbehandelten Probe, die das nachzuweisende Antigen sicher enthält, eingesetzt; als Negativkontrolle eine Probe, die das fragliche Antigen sicher nicht enthält.

Methodische Kontrollen sollen Kreuzreaktivitäten zwischen dem eingesetzten Antikörper, Färbematerialien etc. und Gewebestandteilen ausschließen. Dies wird durch wechselweise Substitution des Primärantikörpers, des Brückenantikörpers und des Färbekomplexes durch Puffer bzw. nichtimmunogenes Serum erreicht. Idealerweise sollten Absorptionskontrollen mitlaufen: Dazu wird der Primärantikörper mit dem gereinigten Antigen absorbiert und damit dann der Schnitt inkubiert. Da allerdings die wenigsten Hersteller gereinigte Antigene kommerziell anbieten, und eine mögliche Verunreinigung des Antigens auch entsprechende falsche Bindung der Antikörper absorbieren würde, werden solche Kontrollen nur sehr selten durchgeführt. Sinnvoller ist der Ersatz des Primärantikörpers durch ein nichtimmunogenes Serum aus der gleichen Spezies, aus der der Primärantikörper kommt, da dadurch falsch positive Reaktionen sicher festgestellt

werden können (Boenisch 1989b; Denk 1986; Sternberger 1979; Taylor and Tandon 1994; Walter, Dohse, and Rudolph 1989).

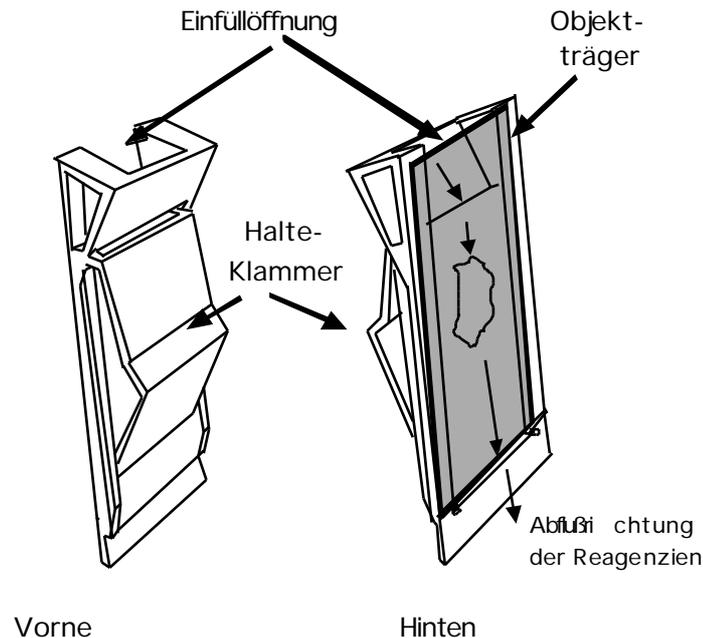
Um eine Überfixierung durch zu lange oder zu stark konzentrierte Formalinbehandlung auszuschließen, empfiehlt sich prinzipiell eine immunhistochemische Färbung von Vimentin durchzuführen. Vimentin als typisches Intermediärfilament des Mesenchym findet sich in nahezu allen Organsystemen des Körpers und kann daher als interne „Überfixierungs-Kontrolle“ eingesetzt werden: Färbt sich Vimentin nicht an, ist erfahrungsgemäß auch jeder andere Antigen-Nachweis negativ (Azumi and Battifora 1987; Battifora 1991; Urban and Hewicker-Trautwein 1994).

Standardisierung der Methode

Besondere Sorgfalt ist bei der Immunhistochemie auf die Reproduzierbarkeit der einzelnen Ergebnisse zu richten: Unter der (idealen) Vorbedingung, daß die Probenbehandlung (Fixation, Entkalkung etc.) bei allen Proben gleich ist, entstehen inkonstante Variablen bei der Durchführung der Methode selbst. In einem Färbeanatz von beispielsweise 30 Schnitten, kann der zeitliche Unterschied zwischen Beschickung des ersten und letzten Schnittes mit Primärantikörper, Brücke, Puffer usw. im ungünstigem Fall jeweils über 5 min. betragen. Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten sind das jeweils ca. 16 % zeitlicher Unterschied zwischen ersten und letztem Schnitt. Durch das eilige Beschicken der Objektträger kann mehr oder weniger Reagent auf den Schnitt gelangen oder das Objekt wird nur unvollständig bedeckt. Zusätzlich kann ein unterschiedlich ausgeprägtes Verdunsten erfolgen, was wiederum nicht reproduzierbar ist. Abhilfe könnte nur eine erhebliche Reduktion der Schnitte pro Färbeanatz auf beispielsweise maximal 5 Schnitte schaffen. Dadurch würde eine größer angelegte Untersuchung allerdings überproportional viel Zeit kosten, wobei Variationen zwischen den jeweiligen Ansätzen immer noch bedeutsam sein können.

Diesem Dilemma ist nur durch den Einsatz (halb)automatisierter Färbesysteme mit Standardprotokollen zumindest teilweise zu entgehen (Briganti et al. 1988; Taylor and Tandon 1994). Zur Zeit werden von unterschiedlichen Herstellern semi- und vollautomatische immunhistochemische Färbeautomaten angeboten, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen und zwischen wenigen Tausend und mehreren zehntausend Mark kosten.

Eine der finanziell günstigeren Lösungen wird in unserem Haus eingesetzt: Die semiautomatische Immundefärbestation Sequenza™ (Fa. Shandon). Dieses System beruht auf dem Einsatz von Mikroreaktionskammern, den Coverplates® (Abbildung 2.3-10). Jeweils ein Schnitt wird auf ein Coverplate montiert, wobei ein kapillarer Reaktionsraum von 100 µl zwischen Objektträgeroberfläche und Cover-

**Abbildung 2.3-10**

Schematische Darstellung der Coverplates® (Shandon, Frankfurt/Main). Modifizierte Darstellung aus dem Bedienungshandbuch.

plate entsteht. Die Objektträger mit Coverplates werden senkrecht in spezielle Kassetten aufgestellt und mittels der Halteklammer fixiert.

Die Reaktionskammer ist unten offen und hat oben eine Einfüllöffnung mit einem Fassungsvermögen von 2 ml. Die Einfüllöffnung wird mit 2 ml Puffer beschickt, der durch den Spalt der Reaktionskammer via Schwerkraft nach unten fließt und unten austritt. Lediglich die letzten 80 µl werden durch die Oberflächenspannung im Reaktionsraum zurückgehalten. Durch Beschicken von 100 µl Reagenz wird der Puffer nach unten verdrängt, und im Spalt bleiben final 80 µl Reagenz stehen. Nach der Inkubation verdrängt die nachfolgende Zugabe von 2 ml Puffer wiederum das Reagenz; es bleiben 80 µl Puffer im Spalt stehen. Dieses Prozedere wird entsprechend dem Protokoll wiederholt. Das Beschicken mit 2 ml Puffer führt in der Reaktionskammer zu einem Verhältnis von etwa 20:1 (Puffer: Reagenz); das entspricht etwa 20 Waschvorgängen. Somit wird jeder Objektträger vollständig bedeckt. Der Mikroreaktionsraum verhindert sowohl Verdunsten als auch andere physikalische Beeinflussungen sowie prozonenartige Phänomene. Die Anordnung der Coverplates ermöglicht es, 50 Schnitte innerhalb von 1 min gleichmäßig zu beschicken.

Literatur Immunhistochemie

- Altmannsberger, M. 1988. *Intermediärfilamentproteine als Marker in der Tumordiagnostik*. Edited by G. Seifert. Vol. 127, *Veröffentlichungen aus der Pathologie (Progress in Pathology)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Athanasou, N.A., J. Quinn, A. Heryet, C.G. Woods, and J.O'D. McGee. 1987. Effect of decalcification agents on immunoreactivity of cellular antigens. *Journal of Clinical Pathology* 40:874 - 878.
- Avrameas, S. 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6:43 - 52.
- Avrameas, S., and J. Uriel. 1966. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *Comptes Rendus de Séances de l'Académie des Sciences Series III Sciences de la Vie (Paris)* 262:2543-2545.
- Azumi, N., and H. Battifora. 1987. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology* 88:286 - 296.
- Baker, J.R. 1958. *Principles of biological microtechnique: A study of fixation and dyeing*. London: Methuen & Co. Ltd.
- Bankfalvi, A., H. Navabi, B. Bier, W. Böcker, B. Jasani, and K.W. Schmid. 1994. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Journal of Pathology* 174:223-228.
- Banks, P.M. 1979. Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hematopathology. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 27:1192-1194.
- Battifora, H. 1991. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *American Journal of Clinical Pathology* 96:669-671.
- Battifora, H., and M. Kopinski. 1986. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 34:1095 - 1100.
- Baumal, R., H.J. Kahn, D Bailey, M.J. Phillips, and W. Hanna. 1984. The value of immunohistochemistry in increasing diagnostic precision of undifferentiated tumours by the surgical pathologist. *Histochemical Journal* 16:1061 - 1078.
- Bergmayer, H.U. 1974. Alkalische Phosphatasen. In *Methoden der enzymatischen Analyse*, edited by H. U. Bergmayer. Weinheim: Verlag Chemie.
- Biberfeld, P. 1975. Demonstration and assaying of IgG antibodies in tissues and on cells by labeled staphylococcal protein A. *Journal of Immunological Methods* 6:249 - 259.
- Bigbee, J.W., J.C. Kosek, and L.E. Eng. 1977. Effects of primary antiserum dilution on staining of „antigen-rich“ tissues with the PAP technique. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 25:433 - 447.

- Blum, F. 1893. Der Formaldehyd als Härtungsmittel. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Mikroskopie und Mikroskopische Technik* 10:314 - 315.
- Bobrow, M.N., T.D. Harris, K.S. Shaugnessy, and G.J. Litt. 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification: application to immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 125:279-281.
- Böck, P. 1989. 4. Fixierung histologischer Präparate. In *Romeis, Benno: Mikroskopische Technik*, edited by P. Böck. München: Urban und Schwarzenberg.
- Boenisch, T. 1989a. Färbemethoden. In *Handbuch immunchemischer Färbemethoden*, edited by S. J. Naish. Hamburg: Dako Diagnostika GmbH.
- Boenisch, T. 1989b. Kontrollen. In *Handbuch immunchemischer Färbemethoden*, edited by S. J. Naish. Hamburg: Dako Diagnostika GmbH.
- Bolon, B., Calderwood, and M.B. Mays. 1988. Conjugated avidin-peroxidase as a stain for mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 25:523 - 525.
- Boon, M.E., and L.P. Kok. 1989. *Mikrowellen-Kochbuch der Pathologie. Die Kunst der mikroskopischen Darstellung*. Leiden: Coulomb Press.
- Borgers, M., and F. Thone. 1975. The inhibition of alkaline phosphatase by L-p-bromotetramisole. *Histochemistry* 44:277-280.
- Bourne, J.A. 1983. *Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden*. 1 ed. Hamburg: Dako Diagnostika.
- Brandtzaeg, P. 1982. Tissue preparation methods for immunohistochemistry. In *Techniques in Immunocytochemistry*, edited by G. R. Bullock and P. Perusz. London: Academic Press.
- Briganti, D.J., L.R. Budgeon, E.R. Unger, D. Koebler, C. Cuomo, T. Kennedy, and J.M. Perdomo. 1988. Immunocytochemistry is automated: Development of a robotic work station based upon the capillary action principle. *Journal of Histo-technology* 11:465-483.
- Bussolati, G., and P. Gugliotta. 1983. Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 31:1419 - 1421.
- Cartun, R.W., and C.A. Pedersen. 1989. An immunocytochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. *Journal of Histotechnology* 12:273-277.
- Cattoretti, G., S. Pileri, C. Parravincini, M.H.G. Becker, S. Poggi, C. Bifulco, G. Key, L. D'Amato, E. Sabattini, E. Feudale, F. Reynolds, J. Gerdes, and F. Rilke. 1993. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Journal of Pathology* 171:83 - 89.
- Cattoretti, G., and A.J.H. Suurmeijer. 1995. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: a review. *Advances in Anatomical Pathology* 2:2-9.
- Chilosi, M, M Lestani, S Pedron, L Montagna, A Benedetti, G Pizzolo, and F Menestrina. 1994. A rapid immunostaining method for frozen sections. *Biotechnic and Histochemistry* 69:235-239.

- Clark, CA, EC Down, and FJ Primus. 1982. The unlabeled antibody method using glucose oxidase-antiglucose oxidase complexes (GAG). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 30:27 - 34.
- Coons, A.H., H.J. Creech, R.N. Jones, and E. Berliner. 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *Journal of Immunology* 45:159 - 170.
- Coons, A.H., H.J. Creech, and Jones R.N. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 47:200 - 202.
- Coons, A.H., and M.H. Kaplan. 1950. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 91:1 - 13.
- Cordell, J.L., B. Falini, W.N. Erber, A.K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K.A.F. Pulford, H. Stein, and D.Y. Mason. 1984. Immunoencymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32:219 - 229.
- Creech, H.J., and R.N. Jones. 1941. The conjugation of horse serum albumin with isocyanates of certain polynuclear aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society* 63:1661 - 1669.
- De Jong, A.S.H., V.A.N. Van Kessel, M. Vark, and A.K. Raap. 1985. Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry. *Histochemical Journal* 17:1119 - 1130.
- Denk, H. 1986. Morphologische Nachweismethoden: Methodisches Spektrum (Prinzipien, Mechanismen und Wertigkeit). *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 70:18 - 27.
- Dikow, A., R. Gossrau, and H.-G. Frank. 1990. Menadiol diphosphate, a new substrate for non-specific alkaline phosphatase in histochemistry and immunohistochemistry. *Histochemistry* 94:217-223.
- Dubois-Dalcq, M., H. McFarland, and D. McFarlin. 1977. Protein A-peroxidase: a valuable tool for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 25:1201 - 1206.
- Ducatelle, R., J. Hoorens, and T. Maenhout. 1986. Immunocytochemistry: recent applications in a advanced diagnostic procedure. Paper read at IVth International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Abstracts., 2 6 June 1986, at Amsterdam.
- Erlanson, R.A. 1984. Diagnostic immunohistochemistry of human tumors. *American Journal of Surgical Pathology* 8:615 - 624.
- Fagraeus, A. 1948. Plasma cellular reaction and its relation to formation of antibodies in vitro. *Journal of Immunology* 58:1 - 19.
- Falini, B., I. De Solas, C. Halverson, J.W. Parker, and C.R. Taylor. 1982. Double labeled-antigen method for the demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 30:21-26.

- Fernley, H.N. 1971. Mammalian alkaline phosphatase. In *The Enzymes*, edited by P. Boyer. New York: Academic Press.
- Fieser, L.F., and H.J. Creech. 1939. The conjugation of amino acids with isocyanates of the anthracene and 1,2-benzanthracene series. *Journal of the American Chemical Society* 61:3502 - 3506.
- Fox, C.H., F.B. Johnson, J. Whiting, and P.P. Roller. 1985. Formaldehyd fixation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33:845 - 853.
- Fraenkel-Conrat, H., B.A. Brandon, and H.S. Olcott. 1947. The reaction of formaldehyde with proteins. IV. Participation of indole groups. *Journal of Biological Chemistry* 168:99.
- Fraenkel-Conrat, H., and H.S. Olcott. 1948. The reaction of formaldehyde with proteins. VI. Crosslinking of amino groups with phenylimidazole or indole groups. *Journal of Biological Chemistry* 174:827.
- Fritz, P., J. Müller, G. Wegner, U. Braun, A. Grau, H.-V. Tuzek, E. Moessner, and R. Schenk. 1985. Immunhistochemie: Theoretische Möglichkeiten, praktische Anwendungen. *Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie* 130:187 - 203.
- Gatter, K.C., C. Alcock, A. Hervet, and D.Y. Mason. 1985. Clinical importance of analysing malignant tumours of uncertain origin with immunohistological techniques. *Lancet* 8441:1302 - 1305.
- Graham, R.C., and M.J. Karnovsky. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 14:291 - 303.
- Graham, R.C., U. Lundholm, and M.J. Karnovsky. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 13:150 - 152.
- Green, M. 1975. Avidin. *Advances in Protein Chemistry* 29:85-133.
- Guesdon, J.L., T. Ternynck, and S. Avrameas. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 27:1131 - 1139.
- Hanker, J.S., P.E. Yates, and C.B. Matz. 1977. A new, specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *Histochemical Journal* 9:789 - 792.
- Heidelberger, M., F.E. Kendall, and C.H. Soo-Hoo. 1933. Quantitative studies on the precipitin reaction. Antibody production in rabbits injected with an azo-protein. *Journal of Experimental Medicine* 58:137 - 152.
- Heras, A., C.M. Roach, and M.E. Key. 1995. Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry. *Modern Pathology* 8:165A.
- Hiramoto, R., K. Engel, and D. Pressman. 1958. Tetramethylrhodamine as immunohistochemical fluorescent label in the study of chronic thyroiditis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 97:611 - 614.

- Hopkins, S.J., and A. Wormald. 1933. Phenyl isocyanate protein compounds and their immunological reactions. *Journal of Biochemistry* 27:740 - 753.
- Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger. 1981a. A comparative study of the PAP-method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *American Journal of Pathology* 75:734 - 738.
- Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger. 1981b. The use of avidin-biotin-peroxydase complex (ABC) in immunoperoxidase technique - a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29:577 - 580.
- Hsu, S.M., and E. Soban. 1982. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metaallic ions and its application for double immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 30:1079 - 1082.
- Huang, S.-N., H. Minassian, and J.D. More. 1976. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigation* 35:383-391.
- Hunyady, B., K. Krempels, G. Harta, and E. Mezey. 1996. Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44:1353-1362.
- Itoh, G., S. Miura, and I. Suzuki. 1977. Immunohistochemical detection of Fc receptor. I. Light microscopic demonstration of Fc receptor by using soluble immune complexes of peroxidase-antiperoxidase immunoglobulin G. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 25:252 - 258.
- Janckila, A.J., L.T. Yam, and C.-Y. Li. 1985. Immunoalkaline phosphatase cytochemistry. Technical considerations of endogenous phosphatase activity. *American Journal of Clinical Pathology* 84:476-480.
- Johansson, O., and J. Backmann. 1983. Enhancement of immunoperoxidase staining using osmium tetroxide. *Journal of Neuroscience Methods* 7:185 - 193.
- Johnson, G.D., E.J. Holborow, and E.J. Dorling. 1978. Immunofluorescence and immunoenzyme techniques. In *Handbook of experimental immunology*, edited by D. M. Weir. Oxford: Blackwell Scientific.
- Kaysers, K., J. Lübcke, and G. Strauch. 1987. Mikrowellenfixierung bioptischer Gewebeproben. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 71:393.
- Kitamoto, T., K. Ogomori, J. Tateishi, and S.B. Prusiner. 1987. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloidosis. *Laboratory Investigation* 57:230 - 236.
- Kortt, A.A., J.A. Hinds, and B. Zerner. 1974. On the specificity and pH dependence of ficin-catalyzed hydrolyses. *Biochemistry* 13:2029-2037.
- Kuhlmann, W.D., and S. Avrameas. 1971. Glucoseoxidase as an antigen marker for light and electron microscopic studies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 19:361-368.
- Landes, B.C., K. Heider, A.L. Krinke, G.J. Krinke, A.T. Mahrous, and R. Hess. 1990. Contribution of immunohistochemistry toward the diagnosis of tumors of laboratory rats. *Experimental Pathology* 40:239 - 250.

- Leong, A.S.-Y. 1993. Immunohistochemistry - theoretical and practical aspects. In *Applied immunohistochemistry for the surgical pathologist.*, edited by A. S.-Y. Leong. London: Edward Arnold.
- Leong, A. S.-Y., M.E. Daymon, and J. Milios. 1985. Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. *Journal of Pathology* 146:313 - 321.
- Leong, A.S.-Y., and P.N. Gilham. 1989. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology* 21:266 - 268.
- Leong, A. S.-Y., J. Milios, and C.G. Duncis. 1988. Antigen preservation in microwave-irradiated tissues. A comparison with routine formalin fixation. *Journal of Pathology* 156:275 - 282.
- Malik, N.J., and M.E. Daymon. 1982. Improved double immunoenzyme labelling using alkaline phosphatase and horseradish peroxidase. *Journal of Clinical Pathology* 35:1092-1094.
- Marshall, J.D., W.C. Eveland, and Smith C.W. 1958. Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technique with a modification of its application. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 98:898 - 900.
- Mason, D.Y., and R. Sammons. 1978. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *Journal of Clinical Pathology* 31:454 - 460.
- Mason, J.T., and T.J. O'Leary. 1991. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39:225 - 229.
- Mason, T.E., R.F. Phifer, S.S. Spicer, R.A. Swallow, and R.B. Dreskin. 1969. An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 17:563 - 569.
- Matthews, J.B., and G.I. Mason. 1984. Influence of decalcifying agents on immunoreactivity of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Histochemical Journal* 16:771 - 787.
- Mayers, C.P. 1970. Histological fixation by microwave heating. *Journal of Clinical Pathology* 23:273.
- Mesulam, M.-M. 1982. Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways - axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In *Tracing neural connections with horseradish peroxidase*, edited by M.-M. Mesulam. New York: John Wiley & Sons.
- Miller, H.R.P. 1972. Fixation and tissue preservation for antibody studies: A review. *Histochemical Journal* 4:305 - 320.
- Milne, E.M., and D.L. Doxey. 1986. Alkaline phosphatase and its isoenzymes in the tissues and sera of normal dogs. *Veterinary Research Communication* 10:229 - 236.

- Moss, D.W. 1974. Multiple forms of alkaline phosphatase: some topics of current interest. *Histochemical Journal* 6:353 - 360.
- Mukai, K., S. Yoshimura, and M. Anzai. 1986. The effects of decalcification on immunoperoxidase staining. *Journal of Surgical Pathology* 10:413 - 419.
- Naish, S.J., ed. 1989. *Handbuch immunchemischer Färbemethoden*. Vol. II. Hamburg: Dako Diagnostika GmbH.
- Nakane, P.K. 1968. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 16:557 - 560.
- Nakane, P.K., and G.B. Pierce. 1967. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 14:929-931.
- Neumüller, O.-A. 1973. *Römpps Chemie-Lexikon*. 7. ed. Stuttgart: Franckh'sche Verlagshandlung.
- Norton, A.J., S. Jordan, and P. Yeomans. 1994. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *Journal of Pathology* 173:371-379.
- Notani, G.W., J.A. Parsons, and S.L. Erlandsen. 1979. Versatility of *Staphylococcus aureus* protein A in immunocytochemistry. Use in unlabeled antibody enzyme system and fluorescent methods. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 27:1438 - 1442.
- Pelstring, R. J., D. C. Allred, R. J. Esther, S. R. Lampkin, and P. M. Banks. 1991. Differential antigen preservation during tissue autolysis. *Human Pathology* 22:237-241.
- Pileri, S.A., G. Roncador, C. Ceccarelli, M. Piccioli, A. Briskomatis, E. Sabbatini, S. Ascani, D. Santini, P.P. Piccaluga, O. Leone, S. Damiani, C. Ercolessi, F. Sandri, F. Pieri, L. Leoncini, and B. Falini. 1997. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *Journal of Pathology* 183:116-123.
- Ponder, B.A., and M.M. Wilkinson. 1981. Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29:981 - 984.
- Porstmann, B., T. Porstmann, and E. Nugel. 1981. Comparison of chromogens for the determination of horseradish peroxidase as a marker in enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 19:435 - 443.
- Reiner, L. 1930. On the chemical alteration of purified antibody proteins. *Science* 72:483 - 484.
- Riederer, B.M., R. Porchet, R.A. Marugg, and L.I. Binder. 1993. Solubility of cytoskeletal proteins in immunohistochemistry and the influence of fixation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41:609 - 616.
- Rott, T., and D. Velkavrh. 1997. Our experience with the enhanced polymer one-step staining in frozen sections. *Acta Oto-Laryngologica Supplementum* 527:114-115.

- Sainte-Marie, G. 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 10:250 - 256.
- Sandusky, G.E., W.W. Carlton, and K.A. Wightman. 1986. Diagnostic immunohistochemistry of canine skin tumors. *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosis* 29:83-92.
- Sato, Y., K. Mukai, S. Watanabe, M. Goto, and Y. Shimosato. 1986. The AMEX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin-embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *American Journal of Pathology* 125:431 - 435.
- Satoh, S., H. Tatsumi, K. Suzuki, and N. Taniguchi. 1992. Distribution of manganese superoxide dismutase in rat stomach: application of Triton X-100 and suppression of endogenous streptavidin binding activity. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40:1157 - 1163.
- Schauer, G. 1992. Unspezifische Bindung von monoklonalen Antikörpern an canine Mastzellen. Paper read at 13 th European Congress of Veterinary Pathology, 8 June 1992, at Graz.
- Schenk, E.A., and C.J. Charukian. 1974. Immunofluorescence counterstains. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 22:962 - 969.
- Shi, S.R., C. Cote, K.L. Kalra, C.R. Taylor, and A.K. Tandon. 1992. A technique for retrieving antigens in formalin-fixed routinely acid-decalcified celloidin-embedded human temporal bone sections for immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40:787 - 792.
- Shi, S.R., M.E. Key, and K.L. Kalra. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39:741-748.
- Shin, R.W., T. Iwaki, T. Kitamoto, and Tateishi. J. 1991. Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissue. *Laboratory Investigation* 64:693-702.
- Somogyi, P., and H. Takagi. 1982. A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience* 7:1779 - 1783.
- Stein, H., K.C. Gatter, H. Asbahr, and D.Y. Mason. 1984. Freeze-dried paraffin-embedded human tissue for antigen labelling with monoclonal antibodies. *Lancet* 14:71-73.
- Stein, H., K.C. Gatter, H. Asbahr, and D.Y. Mason. 1985. Methods in laboratory investigation: freeze-dried paraffin-embedded sections for immunohistologic staining with monoclonal antibodies. *Laboratory Investigation* 52:676 - 683.
- Sternberger, L.A. 1969. Some new developments immunocytochemistry. *Mikroskopie* 25:346 - 361.
- Sternberger, L.A. 1979. *Immunocytochemistry*. Edited by S. Cohen and R. T. McCluskey. 2 ed, *Basic and Clinical Immunology*. New York: Wiley & Sons.

- Sternberger, L.A., P.H. Jr Hardy, J.J. Cuculis, and H.G. Meyer. 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 18:315 - 334.
- Straus, W. 1971. Inhibition of peroxidase by methanol and by methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 19:682-688.
- Straus, W. 1980. Factors affecting the sensitivity and specificity of the cytochemical reaction for the anti-horseradish peroxidase antibody in lymph tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 28:645-651.
- Streefkerk, J.G. 1972. Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 20:829-831.
- Suffin, S.C., K.B. Muck, and J.C. Young. 1979. Improvement of the glucose oxidase immunoenzyme technique. Use of a tetrazolium whose formazan is stable without heavy metal chelation. *American Journal of Clinical Pathology* 71:492-496.
- Taylor, C.R. 1983. Immunoenzyme techniques and their application to diagnostic studies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 420:115.
- Taylor, C.R., and S.-R. Shi. 1994. Fixation, processing, special applications. In *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist*, edited by C. R. Taylor and R. J. Cote. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Taylor, C.R., and A. Tandon. 1994. Theoretical and practical aspects of the different immunoperoxidase techniques. In *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist*, edited by C. R. Taylor and R. J. Cote. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Tharp, M.D., L.L. Seelig, R.E. Tigelaar, and P.R. Bergstresser. 1985. Conjugated avidin binds to mast cell granules. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33:27 - 33.
- Trojanowski, J.Q., M.A. Obrocka, and V.M.Y. Lee. 1983. A comparison of eight different chromogen protocols for the demonstration of immunoreactive neurofilaments or glial filaments in rat cerebellum using the peroxidase-antiperoxidase method and monoclonal antibodies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 31:1217 - 1223.
- Tsutsumi, Y., A. Serizawa, and K. Kawai. 1995. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen: application to intra-operative frozen diagnosis. *Pathology International* 45:108-115.
- Urban, K., and M. Hewicker-Trautwein. 1994. Fixation-dependent vimentin immunoreactivity of mono- and polyclonal antibodies in brain tissue of cattle, rabbits, rats and mice. *Acta Histochemica* 96:365-377.
- Van der Loos, C.M., T. Naruko, and A.E. Becker. 1996. The use of enhanced polymer one-step staining reagents for immunoenzyme double-labelling. *Histochemical Journal* 28:709-714.

- Wachsmuth, E.D. 1976. The localization of enzymes in tissue sections by immuno-histochemistry. Conventional antibody and mixed aggregation techniques. *Histochemical Journal* 8:253-270.
- Walter, J., Karola Dohse, and R. Rudolph. 1989. Eine Modifikation der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) zum Nachweis von viralen Antigen bei der Infektion der Katze durch ein Coronavirus (FIP) und der Infektion des Hundes durch das Parvovirus-Typ 2. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 36:321 - 332.
- Weller, T.H., and A.H. Coons. 1954. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 86:789 - 794.
- Wood, G.S., and R. Warnke. 1981. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29:1196 - 1204.
- Yam, L.T., T. Khansur, and M. Tavassoli. 1988. New developments in immunocytochemistry with immunalkaline phosphatase methods. *Pathology and Immunopathology Research* 7:169-186.

2.4 Proteinanalyse

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Als biochemische Analysemethode hat der konsequente Einsatz der Elektrophorese für die Proteinanalyse von Tumoren bedeutende Fortschritte ermöglicht. Speziell für die Analyse der Zytokeratinverteilung (Achtstaetter et al. 1986; Moll 1993) in normalen und neoplastisch veränderten Geweben hat sich die ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese als wertvoll erwiesen.

Proteinkomponenten aus Geweben lassen sich auf Basis ihrer Molekülgröße mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat (engl., Sodium Dodecyl Sulfate; SDS) Elektrophorese auftrennen (Laemmli 1970; Shapiro, Viñuela, and Maizel 1967). Dazu wird die untersuchende Probe in SDS gelöst. SDS als anionisches Detergenz überdeckt die Eigenladung von Proteinen, so daß anionische Mizellen mit konstanter Ladung entstehen, wodurch Protein-Protein- und Lipid-Protein-Wechselwirkungen unterbunden werden; zusätzlich wird die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteinmoleküle durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken aufgelöst (Shapiro, Viñuela, and Maizel 1967). Dadurch wird es möglich, beinahe alle Proteine zu lösen, wobei SDS-behandelte Moleküle eine hohe elektrophoretische Mobilität aufweisen und einheitlich zur Anode wandern (Westermeier 1990). Störende Schwefelbrücken zwischen Cystein-Resten werden durch Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen wie 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol aufgespalten (Lane 1978). Zur Bestimmung der Laufdauer wird Bromphenolblau dem Probenpuffer zugegeben. Das SDS-Probengemisch wird zusammen mit Markerproteinen, deren Molekulargewichte bekannt sind, auf ein Polyacrylamidgel (PAGE) aufgebracht und im elektrischen Feld aufgetrennt. Polyacrylamid-Gele sind chemisch und mechanisch stabile Trägermedien, die durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer entstehen (Andrews 1986). Da SDS die Proteinladungen bindet, wird die Probe ihrer Masse entsprechend aufgetrennt. Nach dem Gellauf können die aufgetrennten Banden eingefärbt (z.B. mit Coomassie Blue), ihr Molekulargewicht anhand der Laufstrecke bestimmt oder zum Immunblot überführt werden. Die Molekulargewichtsbestimmung wird vielfach mit sogenannten Gel-Readern vollautomatisch vorgenommen. Wo diese Fehlen, kann auch mittels

halblogarithmischen Papier (Shapiro, Viñuela, and Maizel 1967) oder entsprechenden Templates in Tabellenkalkulationsprogrammen das Molekulargewicht annähernd bestimmt werden. Dazu werden zunächst die relativen Mobilitäten (Rf-Werte) der Markerproteine durch Quotientenbildung der von den Markerproteinen im Gel zurückgelegten Strecke und der Bromphenolblau-Front ermittelt. Auf halblogarithmischen Papier wird der Logarithmus der Molekulargewichte der Markerproteine gegen die Rf-Werte aufgetragen; durch Verbinden der Schnittpunkte entsteht eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Molekulargewichte der zu bestimmenden Proteine angenähert abgelesen werden können (siehe Abbildung 2.4-1).

Bei der zweidimensionalen Elektrophorese werden Proben zunächst entweder in der IEF (isoelektrische Fokussierung) (O'Farrel 1975) oder mit dem NEPHG (nonequilibrium pH gradient) (O'Farrel, Goodman, and O'Farrel 1977) aufgetrennt (1. Dimension); als zweite Dimension folgt dann ein SDS-PAGE. Als Ergebnis der Auftrennung erhält man Fleckenmuster, die nach pI und Molekulargewicht getrennt sind. Dadurch gewinnt man erhebliche höher aufgelöste Proteintrennungen. Zur weiteren Identifizierung der aufgetrennten Proteine kann das Laufgut des Gels immungeblotet werden. Auf diese Art und Weise gelang es Moll und Mitarbeitern, den Katalog der humanen Zytokeratine aufzustellen (Moll et al. 1982; Moll et al. 1987).

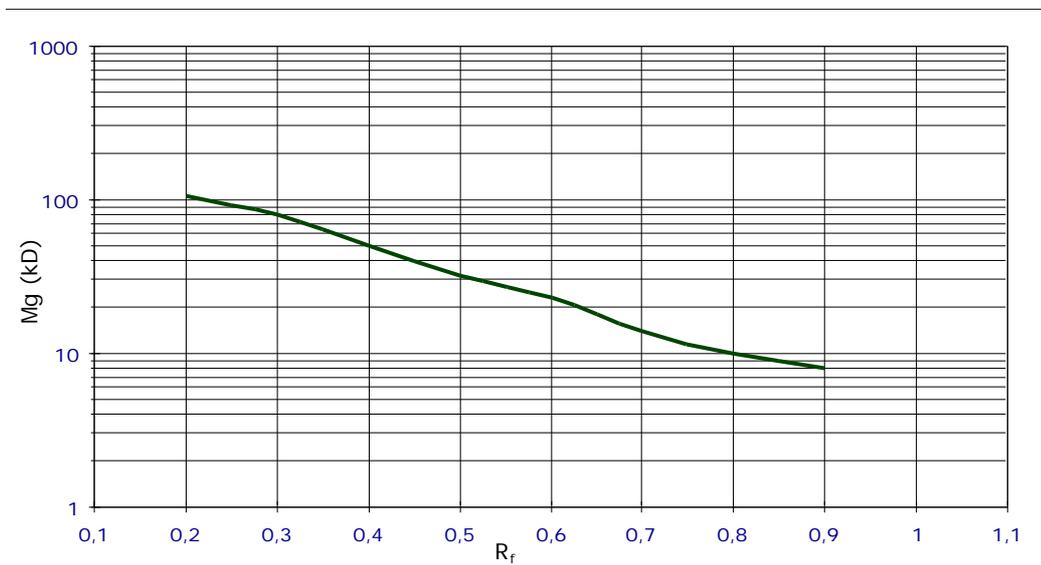


Abbildung 2.4-1

Beispiel einer mit Microsoft Excel erstellten Standardkurve für ein SDS-Gel

Proteinblotting

Die im Gel aufgetrennten Proteine können wie schon erwähnt durch eine Molekulargewichtserrechnung annähernd bestimmt werden. Eine genauere Identifizierung wird möglich, wenn nach dem Auftrennen der Proteinproben im SDS-PAGE oder in der 2D-Elektrophorese diese auf eine feste Phase übertragen werden (Re-nart, Reiser, and Stark 1979) und spezifisch mittels Immunfärbung bestimmt werden = Immunblot (Beisiegel 1986; Gershoni and Palade 1982; Gershoni and Pa-lade 1983; Towbin and Gordon 1984). Dieser Protein-Transfer beruht auf Metho-den, die ursprünglich für DNA-Fragmentanalysen eingeführt wurden: Sou-thern (1975) entwickelte eine Vorgehensweise um in Gel aufgetrennte DNA-Fragmente auf Nitrocellulose-Membranen zu übertragen, die als „Southern Blot“ bekannt wurde. Die auf einer ähnlichen Methode beruhenden Analyse von RNA-Fragmenten wurde in Analogie „Northern Blot“ genannt (Alwine et al. 1979). Um diese „geographischen“ Bezeichnungen zu komplementieren, wurde der Pro-teintransfer auf Nitrozellulose-Membranen „Western Blot“ genannt (Burnette 1981).

Die einfachste (allerdings langwierige) Methode, Proteine von einem Gel auf eine Membran zu übertragen, ist die mittels Diffusion (Bowen et al. 1980). Effektiver und schneller geht es mit dem Kapillarblotting (Southern 1975) oder dem Vaku-um-Blotting (Peferoen, Huybrechts, and De Loof 1982). Für Transfers aus Poly-acrylamidgelen haben sich fast ausschließlich sogenannte Elektroblots (elektro-phoretische Transfers) durchgesetzt (Burnette 1981; Stott 1989; Towbin, Staeh-lin, and Gordon 1979): Neben dem Tankblotten in Tris-Glycin-Puffer mit basi-schem pH (Stott, McLearie, and Marsden 1985) werden häufig die schnelleren Semidry-Blot-Systeme eingesetzt (Gibson 1981; Towbin, Staehlin, and Gordon 1979). Die Proteine werden dabei auf Membranen, meist Nitrocellulose, ge-blottet. Nitrocellulosemembrane binden auf Grund von Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen bis zu 80 µg Protein/cm² (Gershoni and Palade 1982; Gershoni and Palade 1983). Daneben werden noch kationische (seltener anodische oder neutrale) Nylonmembranen oder Polyvinylidendiflorid-Membra-nen (PVDF) mit höheren Proteinbindungskapazitäten (bis 500 µg/cm²) eingesetzt (Gershoni and Palade 1982; Matsudaira 1987; Stott 1989).

Färbung der Nitrocellulosemembran

Als allgemeine und unspezifische Proteinnachweismethoden sind Färbungen mit Amidoschwarz (Batteiger, Newhall, and Jones 1982), Fast Green (Reinhardt and Malamud 1982) und Ponceau Rot (Salinovich and Montelaro 1986) üblich.

Immunblotting

Der spezifische Nachweis aufgetrennter und auf Membranen transferierter Proteine wird immunologisch mittels spezifischer Antikörper vorgenommen (Andrews 1986; Beisiegel 1986). Da Blotmembranen nach dem Transfer von Proteinen immer noch freie Proteinbindungsstellen aufweisen, müssen diese zunächst mit nicht an der Nachweisreaktion beteiligten makromolekularen Substanzen blockiert werden (Stott 1989; Towbin and Gordon 1984). Dazu werden neben proteinhaltigen Blockierungsreagentien wie 2-20 % Rinderserumalbumin (Burnette 1981; Gershoni and Palade 1982; Towbin, Staehlin, and Gordon 1979), unter anderen Gelatine (Renart, Reiser, and Stark 1979), Casein (Ramirez et al. 1983), fetales Kälberserum (Aubertin et al. 1983), oder Magermilchpulver (Johnson et al. 1984) sowie proteinfreie Substanzen wie Tween 20 (Batteiger, Newhall, and Jones 1982; Blake et al. 1984) eingesetzt. Der spezifische Nachweis ist im Prinzip eine indirekte immunhistochemische Methode: Nach Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern wird mit enzym- oder biotinkgekoppelten Sekundär-Antikörpern und angeschlossener Substratreaktion eine mögliche Bindung visualisiert (Blake et al. 1984; Stott 1989).

Literatur Proteinanalyse

- Achtstaetter, T., M. Hatzfeld, R.A. Quinlan, D.C. Parmelee, and W.W. Franke. 1986. Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods in Enzymology* 134:355 - 371.
- Alwine, J.C., D.J. Kemp, B.A. Parker, J. Reiser, J. Renart, G.R. Stark, and G.M. Wahl. 1979. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods in Enzymology* 68:220-242.
- Andrews, A.T. 1986. *Electrophoresis. Theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. Oxford: Clarendon Press.
- Aubertin, A.M., L. Tondre, C. Lopez, G. Obert, and A. Kirn. 1983. Sodium dodecyl sulfate-mediated transfer of electrophoretically separated DNA-binding proteins. *Analytic Biochemistry* 131:127-134.
- Batteiger, B., W.J. Newhall, and R.B. Jones. 1982. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *Journal of Immunological Methods* 55:297-307.
- Beisiegel, U. 1986. Protein blotting. *Electrophoresis* 7:1-18.
- Blake, M.S., K.H. Johnston, G.J. Russell-Jones, and E.C. Gotschlich. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphate-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytic Biochemistry* 136:175-179.

- Bowen, B., J. Steinberg, U.K. Laemmli, and H. Weintraub. 1980. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. *Nucleic Acids Research* 8:1-20.
- Burnette, W.N. 1981. „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated protein A. *Analytic Biochemistry* 115:195-203.
- Gershoni, J.M., and G.E. Palade. 1982. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Analytic Biochemistry* 124:396-405.
- Gershoni, J.M., and G.E. Palade. 1983. Protein blotting: principles and applications. *Analytic Biochemistry* 131:1-15.
- Gibson, W. 1981. Protease-facilitated transfer of high-molecular-weight proteins during electrotransfer to nitrocellulose. *Analytic Biochemistry* 118:1-3.
- Johnson, D.A., J.W. Gautsch, J.R. Sportsman, and J.H. Elder. 1984. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Analysis Techniques* 1:3-8.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680 - 685.
- Lane, L.C. 1978. A simple method for stabilizing protein-sulfhydryl groups during SDS-gel electrophoresis. *Analytic Biochemistry* 86:655-664.
- Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry* 262:10035-10038.
- Moll, Roland, ed. 1993. *Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren*. Edited by G. Seifert. Vol. 142, *Veröffentlichungen aus der Pathology (Progress in Pathology)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia tumors and cultured cells. *Cell* 31:11 - 24.
- Moll, R., S. Winter, C. Zech, and W.W. Franke. 1987. Ein neues zytoplasmatisches Strukturprotein (46 000-Protein) mit eingeschränktem Expressionsspektrum: Potentieller histodiagnostischer Marker zur Unterscheidung metastatischer Adenokarzinome. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 71:526.
- O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250:4007 - 4021.
- O'Farrel, P.Z., H.M. Goodman, and P.H. O'Farrel. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12:1133 - 1142.
- Peferoen, M., R. Huybrechts, and A. De Loof. 1982. Vacuum blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to nitrocellulose. *FEBS Letters* 145:369-372.

- Ramirez, P., J.A. Bonilla, E. Moreno, and P. León. 1983. Electrophoretic transfer of viral proteins to nitrocellulose sheets and detection with immunoperoxidase-bound lectins and Protein A. *Journal of Immunological Methods* 62:15-22.
- Reinhardt, M.P., and D. Malamud. 1982. Protein transfer from isoelectric focusing gels: the native blot. *Analytic Biochemistry* 123:229-235.
- Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera - method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:3116-3120.
- Salinovich, O., and R.C. Montelaro. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separating by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Chemistry* 156:341-347.
- Shapiro, A.L., E. Viñuela, and J.V. Maizel. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28:815-822.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517.
- Stott, D.I. 1989. Immunoblotting and dot blotting. *Journal of Immunological Methods* 119:153-187.
- Stott, D.I., J. McLearnie, and H.S. Marsden. 1985. A gel transfer tank for immunoblotting and its application for analysis of nuclear protein antigens. *Analytic Biochemistry* 149:454-460.
- Towbin, H., and J. Gordon. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding - current status and outlook. *Journal of Immunological Methods* 72:313-340.
- Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.
- Westermeier, R. 1990. *Elektrophorese-Praktikum*. Weinheim: VCH.

3 Insgesamt benutztes Material und eingesetzte Methoden

Grundlage der gesamten Arbeit ist das Paraffin-Archiv der Sektionsfälle und Einzelsendungen des Instituts für Veterinär-Pathologie, Standort Düppel, der Freien Universität Berlin ab dem Jahr 1980 bis 1997. Partiiell wurde bei einzelnen Fragestellungen frisch gewonnenes, tiefgefrorenes Material aus dem gleichen Zeitraum verwendet.

Paraffinmaterial

Das Paraffinmaterial war hauptsächlich formalinfixiert. Bei einigen Fragestellungen wurden parallele Fixationen in Somogyi-Takagi-Fixationsgemisch (Somogyi and Takagi 1982), sowie in Bouin'scher Lösung oder neutral gepuffertem Formalin nach Lillie (Böck 1989) vorgenommen. Institutsüblich wird zur Fixation 4%iges Formalin (1 Teil 37%iges Formaldehyd abgesättigt mit Calciumcarbonat und 6 Teilen Aqua dest.) verwendet. Die Fixationszeiten waren in den meisten Fällen nicht bekannt. Seit 1991 wird zumindest versucht, die Fixationszeiten nicht länger als 36 Stunden dauern zu lassen.

Die Einbettung erfolgte bis 1986 in einem Entwässerungsautomaten der Fa. Jung über 24 Stunden, seither über einen vollautomatischen Unterdruckautomaten mit anschließender Einbettung in Paraplast.

Das Schneiden der Präparate erfolgte an einem Tetrander-Schlittenmikrotom. Nach dem Trimmen der Blöcke wurden ca. 5 µm dicke Schnitte hergestellt, im 30 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf Adhäsivobjektträger aufgezozen. Als Adhäsiva wurden benutzt: Poly-L-Lysin (Huang et al. 1983), Elmar's Glue (Walter, Dohse, and Rudolph 1989), Pritt[®]-Bastelkleber, kommerzielle vorbeschichtete Objektträger (Histosafe-Adhäsions-Objektträger; # E 4000; Fa. Camon, Wiesbaden) und 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (# A-3468; Fa. Sigma, Deisenhofen).

Gefriermaterial

Einige der Proben wurden sofort nach der Entnahme¹ schocktiefgefroren: entweder in Isopentan (n-Methylbutan), das in flüssigem Stickstoff auf ca. -140 °C vorgekühlt wurde oder direkt in flüssigem Stickstoff (Rickert and Maliniak 1989). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in luftdicht verschlossenen Kunststoffröhrchen im Tiefkühlschrank bei -80 °C aufbewahrt.

Zur histologischen und immunhistochemischen Färbung wurden auf einem Gefriermikrotom (Cycrocut, Fa. Jung) ca. 5-10 µm dicke Schnitte hergestellt, die nach dem Lufttrocknen in Aceton (15 Minuten, 4 °C) fixiert und dann erneut luftgetrocknet wurden.

Elektronenmikroskopie

Sofort nach der Probenentnahme wurden die Gewebe in 4%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,3) mehrere Stunden immersionsfixiert, mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,3) bei 4 °C für 1 Stunde gespült, danach 2 Stunden in Osmiumtetroxyd nachfixiert und mit Uranylacetat für weitere 2 Stunden kontrastiert. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Epon für die Elektronenmikroskopie eingebettet. Mit dem Ultracut der Fa. Reichert-Jung wurden Ultradünnschnitte hergestellt und im LKB Ultrastainer mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Elektronenmikroskop EM 10 A hergestellt.

Immunhistochemie²

Neben der Avidin-Biotin-Complex- (ABC) Peroxidase-Methode (Hsu, Raine, and Fanger 1981) wurde hauptsächlich die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-(APAAP)Methode (Cordell et al. 1984) eingesetzt. Die genaue Laboranleitung ist im Anhang A wiedergegeben.

¹ Kollegen der Klinik und Poliklinik für Kleine Haustiere der FU Berlin sowie den Kleintierpraxen Dr. G. Baatz (Berlin) und W. Schaffrath (Berlin) ist an dieser Stelle für die freundschaftliche Zusammenarbeit zu danken.

² Herrn K.-H. Friedrich und Herrn Prof. Dr. H. Lobeck (damals: Institut für Pathologie, UK Rudolf Virchow der FU Berlin, Standort Westend) sei herzlichst gedankt für die freundlichen „Nachhilfestunden“ in Immunhistochemie

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Für die vorliegende Untersuchung wurde die eindimensionale Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Laemmli-Standard (Laemmli 1970) durchgeführt³. Die entsprechenden Protokolle finden sich im Anhang B.

Das Fotografieren der gefärbten Gele erfolgte zu Beginn der Untersuchungen mit Gelbfilter auf Polaroid-Film oder auf einem Leitz-Reprovit-Gerät mit Agfa-Pan-25-Kleinbildfilm. Von den Negativen wurden Abzüge angefertigt, die mit einem Hewlett Packard-Scanner digitalisiert wurden. Später zeigte sich, daß das direkte Digitalisieren der Gele deutlich bessere Ergebnisse ermöglichte: Dazu wurden die Gele zwischen zwei Klarsichtfolien gepackt und dann gescannt.

Immunblot (Western Blot)

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Semidry-Verfahren auf Nitrozellulosemembranen transferiert, die Gesamtproteine mit Ponceau-S rot gefärbt und nach dem Entfärben in einem indirektem Verfahren immunologisch analysiert (Towbin, Staehlin, and Gordon 1979). Die genaue Arbeitsanleitung findet sich im Anhang B.

Die mit Ponceau-S gefärbten Membranen wurden entweder mit einem Leitz-Reprovit-Gerät auf Agfa-Pan-25 fotografiert und die Abzüge eingescannt oder ebenso wie die immungefärbten Membranen direkt eingescannt.

Hard- und Software

An Computer-Hardware standen für diese Untersuchung folgende Geräte zur Verfügung: Ein Intel 486-Rechner, ein Apple Macintosh 660 AV (68040, 20 MB RAM, 1,4 GB Festplatte, Apple quadro-speed CD-ROM-Laufwerk, 17"-Apple-Monitor), ein Hewlett Packard-Scanner II, ein Apple Laserwriter 4/600 und ein Diabelichter Polaroid CI-3000.

An Software wurde eingesetzt: Lotus-Symphony ver. 2 und dBase III auf dem Intelrechner unter MSDOS 6.0. Auf dem Apple Macintosh kamen folgende Programme zum Einsatz: Microsoft Word 5.1 (Textverarbeitung), Microsoft Excel

³ An dieser Stelle ist Herrn PD Dr. *Kremsner* und Herrn Dr.rer.nat. *Prada*, zur Zeit der Untersuchung am Landesinstitut für Tropenkrankheiten (Berlin), dafür zu danken, daß die Durchführung der meisten Untersuchungen in ihrem Labor möglich war und für die vielen hilfreichen Hinweise und Diskussionen.

4.0 (Tabellenkalkulation), Claris FileMaker 4.0 (Datenbankverwaltung), Hewlett Packard Deskscan II Version 2.1 (Scanprogramm), Adope Photoshop 4.01 (Bildbearbeitung), NIH-Image 1.6 (Bildanalyse), StatView 4.5 (Statistik) und Microsoft Powerpoint 4.0 (Präsentation).

Image Analyse

Die Analyse der digitalisierten Bildern erfolgte anhand der Methoden, wie sie beispielsweise Russ (1995) sowie Marchevsky and Bartels (1994) ausführlich darstellen.

Ad Zitation

Die Zitationsordnung hält sich an die Konventionen von *The Chicago Manual of Style* (1982); die bereits veröffentlichten Teile dieser Schrift an die Konventionen der jeweiligen Zeitschriften.

In der Habilitationsschrift werden die Quellen ungekürzt wiedergegeben; in den bereits veröffentlichten Teilen orientieren sich die vorgenommenen Abkürzungen der Zeitschriftentitel vornehmlich an List of journals indexed in Index medicus (1995–1997. Washington: National Library of Medicine) und im Bedarfsfall auch an Serial Sources for the BIOSIS Previews Databases (1995–1997. Philadelphia: Biological Abstracts, Inc.).

Umlaute wie ä, ö, ü in den Quellenangaben – vor allem in deutschsprachiger Zeitschriften – werden prinzipiell als solche zitiert.

Die retrospektiven Literaturrecherchen erfolgten online über die Dokumentationsstelle für Veterinärmedizin der FU Berlin am Deutschen Institut für medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) Köln; primär wurde die Literaturdatenbank Medline (National Library of Medicine, Bethesda [USA]), zusätzlich auch die Literaturdatenbank CAB Vet Science (Commonwealth Agriculture Bureaux International, Wallingford [UK]), abgefragt. Daneben wurden CD-ROM-Recherchen in MedLine (National Library of Medicine) sowie in VetCD und BeastCD (CAB International) mit Hilfe des Programms MacSpirs Version 2.4 (Silver-Platter Information Retrieval System for the Apple Macintosh; Copyright by SilverPlatter International N.V) vorgenommen. Aktuelle Recherchen erfolgten über CURRENT CONTENTS ON DISCETTE LifeScience und über FOCUS ON Veterinary Science and Medicine (Institute for Scientific Information, Philadelphia [USA]).

Literatur zu Material & Methoden

- The Chicago Manual of Style*. 1982. 13. ed. Chicago: The University of Chicago Press.
- Böck, P., ed. 1989. *Romeis, Benno: Mikroskopische Technik*. 17 ed. München: Urban und Schwarzenberg.
- Cordell, J.L., B. Falini, W.N. Erber, A.K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K.A.F. Pulford, H. Stein, and D.Y. Mason. 1984. Immunoencytomatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32:219 - 229.
- Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger. 1981. The use of avidin-biotin-peroxydase complex (ABC) in immunoperoxidase technique - a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29:577 - 580.
- Huang, W.M., S.J. Gibson, P. Facer, J. Gu, and J.M. Polak. 1983. Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-Lysine as a slide coating. *Histochemistry* 77:275 - 279.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680 - 685.
- Marchevsky, A.M., and P.H. Bartels, eds. 1994. *Image analysis: a primer for pathologists*. New York: Raven Press.
- Rickert, R.R., and R.M. Maliniak. 1989. Intralaboratory quality assurance of immunohistochemical procedures. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 113:673-679.
- Russ, J.C. 1995. *The image processing handbook*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Somogyi, P., and H. Takagi. 1982. A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience* 7:1779 - 1783.
- Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.
- Walter, J., Karola Dohse, and R. Rudolph. 1989. Eine Modifikation der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) zum Nachweis von viralen Antigen bei der Infektion der Katze durch ein Coronavirus (FIP) und der Infektion des Hundes durch das Parvovirus-Typ 2. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 36:321 - 332.

4 Ergebnisse

Dieses Kapitel besteht aus fünf Unterkapiteln, in denen kumulativ die zum größten Teil noch unveröffentlichten Resultate der Untersuchungen vorgestellt werden:

- *Zunächst wird anhand einer umfangreichen Auswertung des Sektionsguts die besondere Bedeutung von Neoplasien als Todesursachen beim Hund dargestellt und versucht epidemiologische Rahmendaten des Phänomens „Krebs beim Hund“ zu erheben.*
- *Das nächste Unterkapitel verdeutlicht exemplarisch an Herztumoren den Einsatz verschiedener Marker in der Tumordiagnostik.*
- *Daran schließen sich Untersuchungen zur Haut an, die in drei Unterkapiteln dargestellt werden: Einmal eine Untersuchung zum Zytokeratinbesatz der Epidermis, weiterhin eine Untersuchung zum Zytokeratinprofil von Tumoren der Haut und schließlich der Versuch Papillomaviren in Hauttumoren nachzuweisen.*
- *Der Komplex „Mammatumor“ wird anhand eines Intermediärfilament-Typings und – als Konsequenz des Typings – anhand der immunhistochemischen Suche nach okkulten Metastasen in Lymphknoten abgehandelt.*
- *Das letzte Unterkapitel beschäftigt sich mit einem Zytokeratin-Typing von Lebertumoren.*

Zum jeweiligen Thema werden Stand der Wissenschaft, Material und Methoden sowie Diskussion und Literaturverzeichnis aufgeführt.

Der Stand der Wissenschaft zum Gesamtkomplex ist im Kapitel 2 dargestellt.

4.1 Neoplasien bei seziierten Hunden in Berlin (West)

– *Versuch einer epidemiologischen Analyse*

Einleitung

Da Hunde die gleichen Umweltbedingungen mit dem Menschen teilen, ist es für eine onkologische Komparatistik epidemiologisch bedeutsam, genaue Daten über das Vorkommen und Verhalten von spontanen Neoplasien bei Tieren zur Verfügung zu haben (MacEwen 1990; Misdorp 1996; Thrusfield 1988).

Ausführliche allgemeine Übersichten über Tumorfrequenzen bei Hunden geben beispielsweise Eskens (1983), Kusch (1985) und Misdorp (1990); ein Überblick über ältere Literaturstellen findet sich u.a. bei Cotchin (1972), Dobberstein (1953) und Überreiter (1977).

Ein Hauptproblem statistischer Auswertungen von Sektionsdaten ist ungelöst: Die Grundzusammensetzung der lokalen Hundepopulation (Anzahl, Rasse, Alter, Geschlecht) ist nicht bekannt und außer der Anzahl der bei den Finanzäm-

Im Text vorkommende Abkürzungen:

K	=	Krebs	n.b.	=	nicht bestimmt
oK	=	kein Krebs	m	=	männlich
OR	=	Odds Ratio	mk	=	männlich kastriert
VB	=	95%iger Vertrauensbereich	w	=	weiblich
MW	=	Mittelwert	wk	=	weiblich kastriert
StAbw	=	Standardabweichung	ZW	=	Zwitter
o.A.	=	ohne Angabe	J.	=	Jahre

tern gemeldeten Tiere existieren keine darüber hinausgehenden Daten. Lediglich aus den 60er Jahren liegen grundlegende Untersuchungen an definierten Basispopulationen vor, die eine lokospezifische Inzidenzrate von 1.077 Krebsfällen/ 100.000 Hunden/Jahr in Alameda und Contra Costa Counties in Californien (USA) feststellten (Dorn et al. 1966; Dorn et al. 1968a; Dorn et al. 1968b). Eine weitere Untersuchung an einer definierten Population liegt aus den 70er Jahren aus Oklahoma (USA) vor, die eine Inzidenzrate von 1.126 Krebsfälle/100.000 Hunde/Jahr feststellten (MacVean et al. 1978). Das Fehlen solcher Grundkenntnisse (nicht nur) in Deutschland bedeutet, daß für epidemiologische Untersuchungen üblicherweise ein selektives und kein repräsentatives Untersuchungsmaterial vorliegt (Saracci 1993; Stünzi 1970). Trotzdem können aus Sektionsstatistiken Tendenzen und Trends abgeleitet werden (Krook 1954; Kusch 1985; Stünzi 1970). Daher wurde in dieser Untersuchung versucht, das komplette Sektionsgut an Hunden des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin der Jahre 1980 bis 1996 als eine Fall-Kontroll-Studie aufzufassen und retrospektiv das Risiko an einer Neoplasie zu sterben über die Bildung der Odds Ratio indirekt zu schätzen.

Material und Methoden

Quelle der Daten waren die Sektions- und Biopstättagebücher und das formalinfixierte und paraffineingebettete Material des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin. Einsender der toten Hunde waren neben den Tierkliniken der Freien Universität praktische Tierärzte aus Berlin (West); vereinzelt kamen auch Tiere von privaten Hundehaltern zur Sektion. Ausgeschlossen wurden Hunde, die nicht aus Berlin (West) stammten.

Die Einträge in den Sektionstagebüchern lagen bis 1988 nur schriftlich vor. Von 1988 bis 1995 wurden die Fälle routinemäßig in einer selbst programmierten Datenbank des integrierten Softwarepakets „Lotus Symphony Ver. 2.0®“ (Walter and Ernst 1990) erfaßt. Seit 1995 werden die Sektionsdaten in einer Datenbank des Programms „Filemaker Pro 3.0 für Mactintosh®“ erfaßt. Die Fälle zwischen 1980 und 1988 wurden zunächst in eine Datenbank des relationalen Datenbankprogramms „dBASE III plus®“ eingegeben und 1995 nach „Filemaker Pro 3.0“ konvertiert und weiterverarbeitet. Maßgebend für die Aufnahme in die Datenbank war, daß die pathologisch-anatomische und -histologische Hauptdiagnose unabhängig vom Vorbericht oder der Art des Todes (gestorben oder getötet) „Neoplasie“ lautete. Zur Untersuchung der Evidenz von Hauttumoren wurden zusätzlich die Biopsiefälle der Jahre 1981 bis 1996 herangezogen und analog zur Vorgehensweise bei den Sektionen in eine Filemaker-Datenbank überführt. Die Auswertungen erfolgten mit Hilfe der Programme „Stat-View 4.5“, „Excel 4.0“ und „Filemaker Pro 4.0“.

Erläuterungen zur Datenbank, zur Eingabe der Daten und zur Nomenklatur

Die Rassenbezeichnungen wurden entsprechend der Nomenklatur von Wilcox und Walkowicz (Wilcox and Walkowicz 1993) vereinheitlicht.

Als Geschlechtsbezeichnungen wurden „m“, „mk“, „w“, „wk“ und „Zwitter“ gewählt.

Die Altersangaben wurde in Jahren, bzw. in dezimale Jahresbruchteile (z. B. 6 Monate = 0,5 Jahre) umgerechnet.

Da eine Vielzahl von Untersuchern abwechselnd die Sektionsfälle bearbeiteten, gabe es bei den Diagnosen naturgemäß keine einheitliche Nomenklatur. Daher wurden stichprobenmäßig paraffin eingebettete Proben nachuntersucht, teilweise weitergehend untersucht, verifiziert und – wo notwendig – reklassifiziert. Weiterhin wurden seltene oder zweifelhafte Tumordiagnosen immunhistochemisch überprüft und zum Teil korrigiert.

Die Klassifikation wurde weitgehend der Who (1974; 1976) angelehnt bzw. der Moultons (1990a) angenähert. Weiterhin wurden Neoplasien der Mamma nach einem in Anlehnung an die WHO (Gutberlet 1994; Hampe and Misdorp 1974) erarbeiteten Klassifikationsmuster eingeordnet: alle Tumoren, die Strukturen aufweisen, die eine Differenzierung zu Drüsenepithel erkennen lassen, also alle Neoplasien mit papillären, tubulären oder alveolären Strukturen, wurden je nach Dignität als Adenom oder Adenokarzinom bezeichnet. Fast ausschließlich oder ausschließlich solides Wachstum des epithelialen Gewebes führte zur Diagnose eines soliden Karzinoms. Lagen überwiegend anaplastische epitheliale Zellen vor, bestand ein anaplastisches Karzinom. Bei Beteiligung von Myoepithel, das keine eigenen Malignitätskriterien aufwies, wurde die Neoplasie als komplex bezeichnet. Lagen maligne epitheliale und mesenchymale Komponenten vor, wurde der Tumor als Karzinosarkom angesprochen.

Für die Klassifikation von Neoplasien des lymphatischen System wurden die Begriffe „Leukose“ bzw. „Lymphosarkom“ fallengelassen zu Gunsten des Terminus „Malignes Lymphom“ (Parodi, Dargent, and Crespeau 1988). Diese Neoplasien wurden bisher entsprechend der WHO-Klassifikation (Jarett and Mackey 1974) hauptsächlich auf der Basis ihrer anatomischen Lokalisation und ihres histologischen Erscheinungsbildes klassifiziert. Neuere Erkenntnisse der Lymphozytenentwicklung und die Verfügbarkeit von Antikörpern gegen canine lymphozytäre Oberflächenantigene (Cobbold and Metcalfe 1994) führen dazu, daß die Nomenklatur erheblich weiter immunologisch diversifiziert werden

kann (Greenlee et al. 1990; Majzoub 1997; Parodi, Dargent, and Crespeau 1988). Somit kann in gewissem Umfang Vergleichbarkeit mit humanpathologischen Entitäten (Harris et al. 1994) hergestellt werden.

Da in in der Fachliteratur der WHO-konforme Terminus „Malignes Haemangioendotheliom (Angiosarkom)“ (Weiss 1974) nur selten benutzt wird, wurde zur Vereinfachung auch in dieser Arbeit der Begriff „Hämangiosarkom“ benutzt. Bei Neoplasien des Skeletts wurde die überarbeitete WHO-Klassifikation (Slayter et al. 1994) herangezogen.

Die Lokalisation der Neoplasien und eventuellen Metastasen wurden mit einem einheitlichen Organschlüssel versehen.

Zwischen dem 1.1.1980 und dem 31.12.1996 wurden 11.387 Hunde seziert; in 10.576 Fällen war das Alter bekannt und in 286 Fällen war das Geschlecht nicht dokumentiert. Neoplasien hatten 2.967 Tiere, wovon bei 141 Tieren nur noch Metastasen vorhanden waren und der Primärtumor fehlte. Zahlendifferenzen in den nachfolgenden Tabellen ergeben sich durch fehlende Angaben bezüglich Rasse, Geschlecht und/oder Alter, sowie dem Vorliegen mehrerer Tumorarten und -lokalisationen bei einigen Tieren.

Die Abschätzung von Risikofaktoren (Rasse, Alter, Geschlecht) wurde mit Hilfe der Auswertung von 2 x 2 Kontingenztafeln vorgenommen. Die erwartete Häufigkeit innerhalb der Kontingenztafel wurde als Produkt von Zeilen und Spaltensumme dividiert durch die Gesamtanzahl errechnet (siehe Tabelle 4.1-1):

$$\text{Erwartete Häufigkeit} = \frac{H1 \cdot V1}{N}$$

Für die Bewertung von Risikofaktoren für die Ausbildung von Neoplasien wurde als Schätzwert die „Odds Ratio (OR)“ (Gart 1970; Sachs 1992) gewählt. Als Referenzpopulation wurden alle seziierten Hunde, die den zu untersuchenden

Tabelle 4.1.1

Schematische Darstellung der Vierfeldertafel, auf der die Berechnungen der Odds Ratio beruhen; a = Anzahl der Hunde mit Neoplasien innerhalb einer Gruppe mit einem bestimmten Risikofaktor; b = Anzahl der Hunde ohne Neoplasie innerhalb einer Gruppe mit einem bestimmten Risikofaktor; c = Anzahl der Hunde mit Neoplasie, die nicht zu der Gruppe mit dem bestimmten Risikofaktor gehören; d = Anzahl der Hunde ohne Neoplasie, die nicht zu der Gruppe mit dem bestimmten Risikofaktor gehören; V1 = Anzahl der Hunde mit Neoplasien; V2 = Anzahl der Hunde ohne Neoplasien; H1 = Anzahl der Hunde innerhalb einer Gruppe mit einem bestimmten Risikofaktor; H2= Anzahl der Hunde, die nicht zu der Gruppe mit einem bestimmten Risikofaktor gehören; N = Gesamtzahl aller seziierten Hunde.

	Neoplasie	ohne Neoplasie	Summe
Risikofaktor	a	b	H1 (a+b)
Ohne Risikofaktor	c	d	H2 (c+d)
Summe	V1 (a+c)	V2 (b+d)	N (a+b+c+d)

Risikofaktor nicht aufwies, des gleichen Beobachtungszeitraumes herangezogen.

Die Odds Ratio errechnet sich nach folgender Formel:

$$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

OR kann beliebige Werte > 0 annehmen. $OR = 1$ bedeutet, daß kein Einfluß des Risikofaktors auf Ausbildung einer Neoplasie evident ist. Werte > 1 deuten auf einen Zusammenhang zwischen Risikofaktor und Ausbildung einer Neoplasie hin.

Ob ein Riskofaktor statistisch signifikant ist, läßt sich über den χ^2 -Test nach Mantel und Haenszel (1963; 1959) errechnen:

$$\chi^2 = \frac{(N - 1)(a \cdot d - b \cdot c)^2}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

Die Ergebnisse wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ überprüft, wobei gilt, daß auf dem 5%-Niveau ein echter Risikofaktor vorliegt, wenn $\chi^2 > 3,841$ ist (Sachs 1992). Schließt der approximierter 95%-Vertrauensbereich, der wie folgt errechnet wird

$$VB_{95\%} = OR^{(1 \pm 1,96 \sqrt{1/n})}$$

einen Werts von > 1 ein, gilt ein Risikofaktor als ausgewiesen.

Zusätzlich wurden bei den Auswertungen der Risiken für eine bestimmte Neoplasie, auch Rassen mit besonders hohen Anteilen aufgeführt, auch wenn der Chi-Quadrat-Test unter 3,841 lag.

Ergebnisse und Diskussion

Häufigkeit von Neoplasien bei Hunden im Sektionsgut

Im Untersuchungszeitraum kamen etwa 1 % der in Berlin (West) finanzamtlich gemeldeten Hunde zur Sektion. Bei etwa einem Viertel (genau: bei 26,06 %) der untersuchten Hunde waren Neoplasien die direkte (natürlicher Tod) oder indirekte (Euthanasie durch Tierarzt) Todesursache (siehe Tabelle 4.1-2).

Betrachtet man die relativen Zahlen der Todesursachenstatistik für Menschen in

Tabelle 4.1-2

Prävalenz von Neoplasien als Todesursache im Sektionsgut und Anteil der seziierten Hunde an der in Berlin (West) gemeldeten Hundepopulation¹ zwischen 1980 u. 1996

Jahr	K (n)	K (%)	oK (n)	oK (%)	Summe	Hunde in Berlin (West) ²	davon seziiert (%)
1980	184	21,78	661	78,22	845	98.639	0,86
1981	159	21,03	597	78,97	756	86.770	0,87
1982	132	18,75	572	81,25	704	85.598	0,82
1983	175	25,66	507	74,34	682	83.588	0,82
1984	163	24,11	513	75,89	676	80.549	0,84
1985	210	27,89	543	72,11	753	78.686	0,96
1986	193	25,70	558	74,30	751	76.527	0,98
1987	178	27,34	473	72,66	651	74.991	0,87
1988	174	24,96	523	75,04	697	73.433	0,95
1989	209	27,36	555	72,64	764	71.323	1,07
1990	206	28,89	507	71,11	713	69.530	1,03
1991	226	35,87	404	64,13	630	68.501	0,92
1992	220	31,93	469	68,07	689	65.421	1,05
1993	211	27,12	567	72,88	778	65.389	1,19
1994	133	24,68	406	75,32	539	64.703	0,83
1995	96	24,55	295	75,45	391	-	-
1996	98	26,63	270	73,37	368	-	-
Summe	2.967	26,06	8420	73,94	11.387		

¹ Quelle: Statistisches Landesamt Berlin.

² Angaben für Berlin (West) nur bis einschließlich 1994 erhältlich.

Tabelle 4.1-3

Krebs als Todesursache bei Menschen in der Bundesrepublik Deutschland zwischen 1980 und 1995

Jahr	Gesamt n	Krebs n	Prozent Krebs	Gestorb.			Gestorb.		
				Männer	Krebs/ Männer	Prozent Krebs/ M	Frauen	Krebs/ Frauen	Prozent Krebs/ F
1980	714.117	164.236	23,00	348.015	81.556	23,43	366.102	82.680	22,58
1981	722.192	165.923	22,97	349.080	82.305	23,58	373.112	83.618	22,41
1982	715.857	166.886	23,31	344.275	82.737	24,03	371.582	84.149	22,65
1983	718.337	167.987	23,39	343.800	83.280	24,22	374.537	84.707	22,62
1984	696.118	165.962	23,84	332.990	82.283	24,71	363.128	83.679	23,04
1985	704.296	168.767	23,96	334.382	83.908	25,09	369.914	84.859	22,94
1986	701.832	168.714	24,04	330.206	83.403	25,26	371.626	85.311	22,96
1987	687.419	171.497	24,95	324.629	85.094	26,21	362.790	86.403	23,82
1988	687.516	174.253	25,35	322.939	86.746	26,86	364.577	87.507	24,00
1989	697.730	175.348	25,13	326.008	87.657	26,89	371.722	87.691	23,59
1990	713.335	171.552	24,05	330.439	86.251	26,10	382.896	85.301	22,28
1991	707.818	172.461	24,37	329.424	86.594	26,29	379.394	85.867	22,63
1992	695.268	173.708	24,98	322.903	87.538	27,11	372.365	86.170	23,14
1993*	897.270	213.748	23,82	415.874	107.820	25,93	481.396	105.928	22,00
1994	884.661	212.391	24,01	409.375	107.266	26,20	475.286	105.125	22,12
1995	884.588	212.913	24,07	385.984	108.334	28,07	459.237	104.579	22,77

* vor 1993 betreffen die Zahlen nur die "alte" Bundesrepublik Deutschland

der „alten“ Bundesrepublik (Tabelle 4.1-3) ergibt sich für Neoplasien als Todesursache ein ähnlicher relativer Anteil (Statistisches Bundesamt 1981-1996) von etwa 25 %.

In der Literatur findet sich eine Vielzahl unterschiedlicher Mitteilungen zum Vorkommen von Neoplasien bei Hunden, die allerdings nur beschränkt miteinander vergleichbar sind: Verschiedene Untersucher (Bronson 1982; Cotchin 1972; Eskens 1983; Frese 1985; Geisel et al. 1990; Geisenberger 1990; Kusch 1985) benutzen reine Sektionsstatistiken, zeigen relative Verteilungen auf und übertragen ihre Ergebnisse z. T. auf alle Hunde. Andere Untersucher (Bastianello 1983; Brodey 1970b; Brouwer et al. 1995; Cohen et al. 1974; Dorn et al. 1968b; Dutton and Moore 1987; Eichelberg and Seine 1996; MacVean et al. 1978; Priester and Mantel 1971; Priester and McKay 1980; Rostami et al. 1994; Überreiter 1977) greifen auf Datenmaterial von Klinikpatienten, aus Biopsiesammlungen, von Zuchtverbänden und auf eine meist weniger genau definierte Referenzpopulation zurück. Bei solchen Untersuchungen ist allerdings zu berücksichtigen, daß klinische Untersuchungen und biopsische Tumor-Statistiken zur Clusterbildung für Haut-, Mamma- und Hodentumore führen (Brodey 1970b; Eskens 1983; Wagstaff, Goyings, and Langham 1967), so daß zur Zeit nur Sektionsstatistiken – wie bereits Krook (1954) postulierte – einen wenn auch ungenauen Hinweis auf das Vorkommen von Neoplasien ermöglichen.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Anteil an seziierten Hunden von etwa 1 % an der Gesamthundepopulation in Berlin (West) ist sicherlich nicht repräsentativ, da verschiedene selektiv wirksame Faktoren, auf die u.v.a. schon von Sandersleben, Schäffer und Weisse (1973), Überreiter (1977), Stünzi (1970; 1972) sowie Stünzi und Lott-Stolz (1965) hingewiesen haben und die auch bei Eskens (1983) und Kusch (1985) diskutiert werden, einen Einfluß auf die Zusammensetzung des Untersuchungsmaterials haben: Neben geographische Besonderheiten – z.B. höhere Anteile von Tumoren des Geschlechtsapparates in bestimmten Gebieten (Chiti and Amber 1992; Phangcho, Dutta, and Mukit 1990; Rostami et al. 1994) – spielen Bereitschaft und ökonomische Situation der Einsender, Forschungsschwerpunkte an den Instituten eine Rolle. Bender, Dorn und Schneider (1983) weisen beispielsweise daraufhin, daß Hunde, bei denen bereits in der Vergangenheit ein Tumor diagnostiziert wurde, von den Besitzern öfters dem Tierarzt vorgestellt werden, häufiger biopsisch überwacht werden und eher zur Sektion gelangen als andere Hunde. Trotz dieser Einschränkungen ist die hohe Übereinstimmung der relativen Anteile von Neoplasien bei Hunden – z. B. bei Eichelberg und Seine (1996) 27,3 %, bei Eskens (1983) 20,4 % – und bei Menschen (24,09 %) erstaunlich. Auch alterskorrigierte Vergleiche zwischen Hund und Mensch kommen zu ähnlichen Ergebnissen: Eine Inzidenz von 300 Krebsfällen/100.000 Individuen/Jahr beim Menschen und 213 Fälle/100.000 Individuen/ Jahr beim Hund (Schneider, Dorn, and Klauber 1968).

Diese Übereinstimmungen sind sicher zufällig, lassen jedoch einen Trend vermuten, so daß sich spontane Neoplasien beim Hund als Modell für onkologische Fragestellungen beim Menschen empfehlen (Albert, Benjamin, and Shukla 1994; Brodey 1979; Dobberstein 1957; Garbe 1988; Hahn et al. 1994; Hamilton 1974; Misdorp 1996; Schneider 1970; Strandberg and Goodman 1974; Thrusfield 1988). Die Prävalenz von 26,06 % Neoplasien im Berliner Sektionsgut zeigt eine mehr oder weniger ähnliche Übereinstimmung mit Eichelberg et al. (1996) oder Eskens (1983), während sie zum Teil deutlich höher als bei Geisel et al. (1990)¹ mit 17,3 % , bei Kusch (Kusch 1985) mit 16,59 % oder bei von Sandersleben et al. (von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973) mit 16,9 % ausfällt. Das liegt zum Teil auch daran, daß die zuletzt erwähnten Untersucher alle benignen Neoplasien und Neoplasien des ZNS² von der Untersuchung ausgeschlossen haben. Mit Ausnahme von Überreiter (1977) (33,4 %) weisen rein klinisch orientierte Untersuchungen deutlich kleinere Inzidenzraten aus (Cohen et al. 1974; Dorn et al. 1968b; Kurzman and Gilbertson 1986; MacVean et al. 1978).

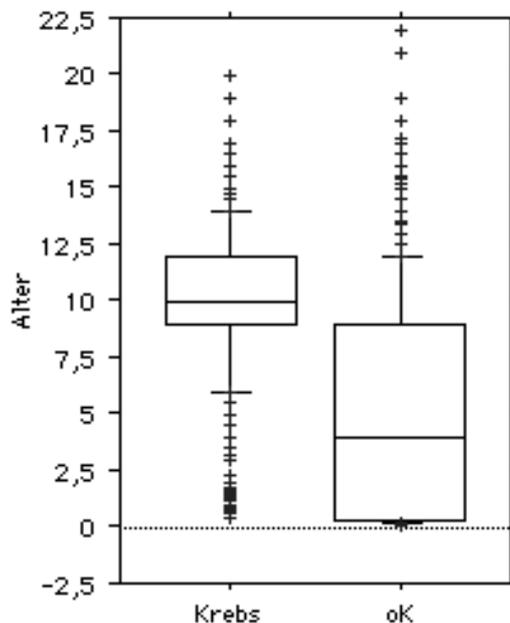
Alter

Eine Übersicht über die Altersverteilung der seziierten Tiere geben die Abbildung 4.1-1 sowie die Tabellen 4.1-4, 4.1-5 und 4.1-6: Tiere mit Neoplasien waren mit einem Durchschnittsalter von 10,29 Jahren deutlich älter als die Gruppe ohne Neoplasien mit durchschnittlich 5,19 Jahren.

Dies gilt nicht nur für alle untersuchten Hunde insgesamt, sondern auch für die unterschiedliche Rassen (Tabelle 4.1-6). Die Odds Ratio liegt in den Gruppen ab dem 7. bis zum 18. Lebensjahr über 1. Ab dem 18. Lebensjahr wird das

Abbildung 4.1-1

Boxplot: Altersverteilung der Hunde mit (Krebs) und ohne Neubildungen (oK)



¹Zum Münchener Datenmaterial von Geisel et al. (1990), Kusch (1985) und Geisenberger (Geisenberger 1990) ist zu bemerken, daß es sich überschneidet: Kusch berichtet über das Vorkommen von Neoplasien zwischen 1970 und 1984, Geisel et al. ergänzen um die Jahre 1950-1983, sowie 1984 bis 1989; Geisenberger wiederum berichtet über die Jahre 1951 bis 1969; zusätzlich sind in diesen Untersuchungen ZNS-Tumoren nicht berücksichtigt.

Tabelle 4.1-4

Deskriptive Altersverteilung der seziierten Hunde (n=10.756) im Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin (1980–1996)

	ohne Krebs	Krebs
Anzahl	7852	2904
fehlende Werte	568	63
Mittelwert (J.)	5,188	10,288
Standardabweichung	4,875	3,027
Minimum (J.)	0,0001	0,4167
Maximum (J.)	22	20
Varianz	23,76882	9,16424
Modalwert	8	10
Perzentilen		
10	0,1667	6
25	0,3333	9
50	4	10
75	9	12
90	12	14

Krebsrisiko allerdings wieder deutlich geringer. Nicht erstaunlich ist, daß spontane Neoplasien mit dem Alter korrelieren und somit eher bei älteren Tieren (\bar{O} 10,29 Jahre) als bei jüngeren befundet werden können. Ähnliches berichten beispielsweise Bronson (1982) (\bar{O} 9,8 Jahre), Cohen et al. (1974) (\bar{O} 9,1 Jahre), Dutton und Moore (1987) (\bar{O} 8,2 Jahre), Eskens (1983) (\bar{O} 8,8 Jahre), Geisel et al. (1990) (\bar{O} 9,7 Jahre) oder Kusch (1985) (\bar{O} 9,44 Jahre). Entsprechend steigt ab dem 7. Lebensjahr die Odds Ratio und damit das Risiko für

Ausbildung von Neoplasien deutlich über 1. Es entspricht prinzipiell den Ergebnissen anderer Untersucher (Albert, Benjamin, and Shukla 1994; Bronson 1982; Cohen et al. 1974; Kosugi 1973; Priester and Mantel 1971; Priester and McKay 1980; Rahko 1968), daß Neoplasien vorwiegend ältere Hunde betreffen, wenn auch im Berliner Sektionsgut das Durchschnittsalter höher liegt als in anderen Studien.

Die Tatsache, daß in hohem Alter das Krebsrisiko wieder sinkt, ist ein Phänomen, daß auch in der Humanmedizin beobachtet werden kann (Smith 1996). Das niedrige Durchschnittsalter von 5,19 Jahren der Hunde ohne Krebs ist auf die hohe Jungtiersterblichkeit (in der Altersklasse von 0-1 Jahren finden sich 25 % der seziierten Hunde) vor allem durch Infektionskrankheiten zurückzuführen (Ebel 1984; Eichelberg and Seine 1996; Suter 1977; Walter and Kirchoff 1995).

Geschlecht

Tabelle 4.1-7 zeigt den relativen Anteil von Hunden mit Neoplasien bei den unterschiedlichen Geschlechtern. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Tieren betrug bei allen seziierten Tieren 1,21, bei Hunden ohne Neoplasien 1,28 und bei denen mit Geschwülsten 1,04. Das relative Risiko an Geschwülsten zu erkranken, lag mit OR=1,23 bei weiblichen Hunden höher als bei Rüden.

Tabelle 4.1-5

Relativer Anteil (%) und Odds Ratio (OR) für Neoplasien in unterschiedlichen Altersgruppen von Hunden im Sektionsmaterial des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin (1980—1996)

Von () bis (<) Jahre	K (n)	K (%)	o K (n)	o K (%)	n, insg.	%, insg.	K/oK	VB	OR	VB
0 – 1	8	0,28	2697	34,4	2.705	25,15	0,003	0,007	0,005	0,004
1 – 2	20	0,69	441	5,62	461	4,29	0,045	0,17	0,117	0,08
2 – 3	16	0,55	289	3,68	305	2,84	0,055	0,224	0,145	0,094
3 – 4	35	1,21	327	4,16	362	3,37	0,107	0,391	0,281	0,202
4 – 5	51	1,76	313	3,99	364	3,38	0,163	0,576	0,431	0,322
5 – 6	75	2,58	276	3,52	351	3,26	0,272	0,942	0,728	0,563
6 – 7	114	3,93	349	4,44	463	4,3	0,327	Chi-Quadrat < 3,841		
7 – 8	167	5,75	361	4,6	528	4,91	0,463	1,049	1,266	1,528
8 – 9	238	8,2	494	6,29	732	6,81	0,482	1,133	1,33	1,562
9 – 10	304	10,47	411	5,23	715	6,65	0,74	1,819	2,117	2,464
10 – 11	452	15,56	470	5,99	922	8,57	0,962	2,536	2,895	3,304
11 – 12	347	11,95	361	4,6	708	6,58	0,961	2,427	2,816	3,267
12 – 13	397	13,67	358	4,56	755	7,02	1,109	2,873	3,315	3,825
13 – 14	306	10,54	286	3,64	592	5,5	1,07	2,655	3,116	3,657
14 – 15	192	6,61	200	2,55	392	3,64	0,96	2,228	2,709	3,294
15 – 16	109	3,75	115	1,46	224	2,08	0,948	2,031	2,624	3,39
16 – 17	49	1,69	64	0,82	113	1,05	0,766	1,448	2,089	3,014
17 – 18	19	0,65	24	0,31	43	0,4	0,792	1,192	2,148	3,872
18 – 19	3	0,1	11	0,14	14	0,13	0,273	2,63	0,737	0,206
19 – 20	1	0,03	2	0,03	3	0,03	0,5	Chi-Quadrat < 3,841		
20 – 21	1	0,03	0	0	1	0,01	0	Chi-Quadrat < 3,841		
21 – 22	0	0	2	0,03	2	0,02	0	Chi-Quadrat < 3,841		
22 – 23	0	0	1	0,01	1	0,01	0	Chi-Quadrat < 3,841		
Summe	2.904	100	7.852	100	10.756	100				

Bei 631 Tieren fehlten die Altersangaben

Obwohl das Verhältnis von Rüden zu Hündinnen bei Tieren mit Neoplasien mit 1,04 nahezu gleich ist, zeichnen sich bei der Odds Ratio (OR) mit 1,23 für Hündinnen höhere Werte ab als für Rüden mit 0,88. Auch dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (Cohen et al. 1974; Eskens 1983; Kosugi 1973; Kusch 1985; Priester and Mantel 1971; Priester and McKay 1980; Rahko 1968; von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973). Der relativ hohe Anteil an Mammatumoren bei weiblichen Tieren ist dabei für die Verschiebung verantwortlich (Bender, Dorn, and Schneider 1984; Kusch 1985). Die höhere OR für kastrierte Tiere ist allerdings erstaunlich. Eine mögliche Erklärung dafür – außer lokalen Gewohnheiten – könnte mit der sorgfältigeren Überwachung der Tiere durch die Besitzer zusammenhängen, da häufig Kastrationen nach Neoplasien (beispielsweise nach Perianaltumoren bei Rüden; frühe Ovariohysterektomie bei Mammatumoren) durchgeführt werden (Brouwer et al. 1995).

Tabelle 4.1-6
Rassenabhängige Mittelwerte des Lebensalter von Hunden mit und ohne Neoplasien
(1980–1996)

Rasse	n, insg.	MW	±StAbw	n, OK	MW	±StAbw	n, K	MW	±StAbw
Afghane	93	6,93	4,799	59	5,162	4,962	34	9,998	2,379
Basset	59	9,093	3,765	41	8,402	4,068	18	10,667	2,376
Beagle	124	5,745	5,152	97	4,339	4,796	27	10,796	2,603
Bernhardiner	52	5,147	3,768	44	4,514	3,609	8	8,625	2,669
Bobtail	16	8,094	3,652	71	4,212	4,357	87	4,926	4,479
Boxer	438	7,132	4,016	222	5,012	4,191	216	9,312	2,304
alle Bulldoggenarten	44	4,744	4,889	36	4,166	5,027	8	7,344	3,319
Chihuahua	105	3,301	4,117	96	2,881	4,018	9	7,778	1,986
Chow Chow	50	4,568	4,69	42	3,557	4,056	8	9,875	4,39
Cocker Spaniel	617	8,02	4,975	395	6,18	5,09	222	11,293	2,444
Collie	115	7,867	4,275	82	7,008	4,53	33	10,003	2,566
Dalmatiner	57	8,836	4,617	38	7,754	4,754	19	11	3,528
Dobermann	108	5,041	3,902	86	4,493	3,91	22	7,182	3,111
alle Doggenarten	89	5,254	3,582	73	4,799	3,541	16	7,328	3,08
DSH	1684	6,009	4,424	1211	4,708	4,307	473	9,34	2,602
Golden Retriever	46	2,78	3,774	37	1,646	2,931	9	7,444	3,321
Hovawart	59	6,889	3,993	40	5,861	4,152	19	9,053	2,592
Malteser	49	2,023	2,935	48	1,878	2,782	1	9	
Mix	2187	6,463	5,297	1538	4,727	5,055	649	10,577	3,153
Neufundländer	48	4,53	4,219	44	4,249	4,298	4	7,625	0,479
Pekingese	109	6,507	5,094	98	5,89	4,911	11	12	3,066
alle Pudelarten	882	9,391	4,826	596	8,211	5,161	286	11,85	2,72
Rottweiler	292	3,657	3,95	228	2,373	3,19	64	8,232	2,856
alle Schnauzerarten	256	7,302	4,516	164	5,862	4,549	92	9,87	3,111
Sennenhund, Berner	40	6,436	3,241	20	6,1	3,555	20	6,771	2,948
alle Setterarten	116	6,994	4,813	76	5,38	4,904	40	10,063	2,704
Shi-Tzu	66	4,612	5,051	56	3,489	4,487	10	10,9	3,071
Spitz	41	8,335	4,596	32	7,461	4,803	9	11,444	1,509
alle Teckelarten	1097	8,057	4,96	855	7,084	5,033	242	11,495	2,631
alle Terrierrassen	1131	5,046	5,103	950	3,956	4,677	181	10,766	2,993
Terrier, Airedale-	54	8,284	4,227	33	7,01	4,497	21	10,286	2,849
Terrier, Bull-	108	3,88	4,686	94	2,979	4,106	14	9,929	3,852
Terrier, Fox-	97	7,81	5,111	65	5,913	4,949	32	11,661	2,734
Terrier, Pitbull-	37	1,806	2,442	33	1,268	1,763	4	6,25	2,986
Terrier, Scotch-	41	6,596	4,919	25	4,197	4,523	16	10,344	2,688
Terrier, Yorkshire-	551	4,42	4,933	501	3,789	4,628	50	10,74	3,129

Sensibilisierte Besitzer werden öfter beim Tierarzt vorstellig, sind eventuell eher an einer postmortalen Abklärung interessiert und verzerren dadurch das Bild (Bender 1981; Bender, Dorn, and Schneider 1983).

Tabelle 4.1-7

Geschlechtsverteilung der seziierten Hunde und geschätztes Risiko (RR) im Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin (1980—1996)

	K	%	oK	%	Summe	%	VB	OR	VB
m	1.433	48,64	4.477	54,9	5.910	53,24	0,846	0,778	0,715
mk	70	2,38	104	1,28	174	1,57	1,394	1,884	2,546
m, total	1.503	51,02	4.581	56,17	6.084	54,81	0,884	0,813	0,747
w	1.304	44,26	3.368	41,3	4.672	42,09	1,037	1,129	1,229
wk	139	4,72	201	2,46	340	3,06	1,578	1,96	2,435
w, total	1.443	48,98	3.569	43,76	5.012	45,15	1,134	1,234	1,343
Zw	0	0	5	0,06	5	0,05	n.b.	n.b.	n.b.
Summe	2.946	100	8.155	100	11.101	100			

Bei 286 Tieren (21 K, 265 oK) war das Geschlecht nicht dokumentiert

Rassenprävalenzen für Neoplasien

Die Tabelle 4.1-8 gibt einen Überblick über die relativen Prävalenzen von Neoplasien bei den häufigsten Rassen im Sektionsgut, sowie über statistische Schätzwerte.

Mit $OR > 2$ zeigen auf dem 5 %igen Wahrscheinlichkeitsniveau Boxer und Berner Sennenhund deutlich, mit OR zwischen < 2 und < 1 Airedaleterrier, Cocker Spaniel, Afghane, Schnauzer, Pudel und auch Mischlingsrassen weniger deutlich ein signifikantes Risiko für die Ausbildung von Neoplasien an. Fast die Hälfte (49 %) aller sezierter Boxer hatten eine oder mehrer Geschwülste.

Damit ist der Boxer die Rasse mit dem höchsten Risiko für Neoplasienausbildung. Das entspricht einer Vielzahl von Mitteilungen in der Literatur (Bender 1981; Cohen et al. 1974; Eskens 1983; Geisel et al. 1990; Howard and Nielsen 1965; Kusch 1985; Priester and McKay 1980; Rahko 1968; Stünzi and Lott-Stolz 1965).

Ein erhöhtes Krebsrisiko für Airedaleterrier wird auch von einer Vielzahl von Untersuchern beschrieben (Eskens 1983; Kosugi 1973; Kusch 1985; Priester and McKay 1980; Rahko 1968) beschrieben, während beim Deutschen Schäferhund und beim Pudel unterschiedliche Auffassungen bestehen (Eskens 1983; Kosugi 1973; Kusch 1985). Eine allgemeine Disposition von Mischlingsrassen und Schnauzern wird lediglich noch von Gutsche (1964) angenommen. Das im Berliner Untersuchungsgut festgestellte Krebsrisiko für Afghanen und Cocker Spaniel bestätigt die Arbeit von Priester und McKay (1980).

Der Risikofaktor Rasse zeigt bei Malteser, Chihuahua, Neufundländer, verschiedenen Terrierschlägen, Pekingesen, Teckeln und anderen sogar einen „Nutzen“

Tabelle 4.1-8

Rassenabhängiges Relatives Risiko für Neoplasien (OR 1 = Risiko besteht)

Rasse	K	oK	n	VB	OR	VB
Boxer	221	230	451	2,389	2,866	3,439
Sennenhund, Berner	20	22	42	1,443	2,591	4,651
Schnauzer, Mittel-	20	29	49	1,121	1,964	3,441
Pudel, Klein-	39	58	97	1,286	1,92	2,867
Terrier, Scotch-	16	25	41	0,98	1,821	3,385
Terrier, Airedale-	22	35	57	1,056	1,79	3,034
Cocker Spaniel	230	413	643	1,38	1,629	1,922
Afghane	34	62	96	1,03	1,563	2,372
alle Schnauzerschläge	94	177	271	1,184	1,524	1,961
Schnauzer, Riesen-	35	66	101	1,004	1,511	2,275
alle Pudelschläge	292	622	914	1,184	1,369	1,583
Mix	661	1689	2350	1,032	1,142	1,264
Deutscher Schäferhund	482	1289	1771	0,957	1,073	1,203
Teckel	246	883	1129	0,666	0,772	0,895
Rottweiler	66	261	327	0,542	0,711	0,934
alle Bulldoggenschläge	9	39	48	0,318	0,654	1,344
Shi-Tzu	11	59	70	0,279	0,527	0,994
Bernhardiner	8	46	54	0,235	0,492	1,028
Chow Chow	8	50	58	0,219	0,453	0,938
Terrier, Bull-	13	81	94	0,256	0,453	0,803
Pekingese	12	101	113	0,188	0,334	0,592
Terrier, Pitbull-	4	38	42	0,113	0,298	0,786
Terrier, West-Highland-White-	12	114	126	0,169	0,296	0,519
Terrier, Yorkshire-	52	543	595	0,198	0,259	0,339
Neufundländer	4	44	48	0,099	0,257	0,665
Chihuahua	9	106	115	0,128	0,239	0,447
Malteser	1	51	52	0,013	0,055	0,23
alle Terrierschläge	294	937	1231	Chi-Quadrat < 3,841		
alle Setterschläge	41	81	122	Chi-Quadrat < 3,841		
Collie	33	84	117	Chi-Quadrat < 3,841		
Terrier, Fox-	32	66	98	Chi-Quadrat < 3,841		
Beagle	28	113	141	Chi-Quadrat < 3,841		
Dobermann	25	92	117	Chi-Quadrat < 3,841		
Pudel, Zwerg-	21	77	98	Chi-Quadrat < 3,841		
Dalmatiner	19	38	57	Chi-Quadrat < 3,841		
Hovawart	19	41	60	Chi-Quadrat < 3,841		
Schnauzer, Zwerg-	19	49	68	Chi-Quadrat < 3,841		
Basset	18	43	61	Chi-Quadrat < 3,841		
Dogge	17	76	93	Chi-Quadrat < 3,841		
Bobtail	16	73	89	Chi-Quadrat < 3,841		
Golden Retriever	10	42	52	Chi-Quadrat < 3,841		
alle Spitzschläge	9	33	42	Chi-Quadrat < 3,841		

an, da diese Rassen signifikant weniger Neoplasien entwickelt haben. Das ist in

Übereinstimmung mit etlichen Untersuchern (Eskens 1983; Kusch 1985; Priester and McKay 1980).

Insgesamt gesehen gibt es nur für wenige Rassen (z.B. Boxer, Airedaleterrier, Chihuahua) übereinstimmende Auffassungen zum Vorhandensein beziehungsweise Fehlen einer Disposition. Offensichtlich führen örtliche und zeitliche Besonderheiten in den Zusammensetzungen der Hundepopulationen zu einer speziellen Clusterbildung, die das Gesamtbild entsprechend verzerrt.

Unabhängig von dieser Betrachtung zum allgemeinen Krebsrisiko von Geschlecht, Alter und Rassen werden sich im folgenden bei den Organkapiteln noch Verschiebungen in der Rassendisposition zeigen.

Organverteilung der Neoplasien

Betrachtet man die Organsysteme, die Neoplasien aufweisen (Primärtumoren und Metastasen) ergab sich folgendes Bild: In der Leber, dem Atmungstrakt, dem lymphohämatopoetischen System und im Harnapparat kamen Neoplasien am häufigsten vor (Tabelle 4.1-9). In Lunge, Leber und Niere spielten Metastasen, unter anderem bedingt durch die Filterfunktionen dieser Organe für Tumoremboli, eine größere Rolle als Primärtumore (Priester and McKay 1980; von Dewitz 1987).

Tabelle 4.1-9

Häufigkeit von Tumoren (inkl. Metastasen) in unterschiedlichen Organsystemen bei 2.967 Tumorträgern (bei 141 Tieren waren nur Metastasen vorhanden; Mehrfachnennungen möglich)

Organsystem	autochthone Tumoren	Meta-stasen		%	% aller Obduktionen
Lymphohämatopoetisches System	728	458	1186	39,97	10,42
Mamma	409	4	413	13,92	3,63
Endokrinum	312	32	344	11,59	3,02
Verdauungstrakt	290	8	298	10,04	2,62
Binde- u. Stützgewebe	220	106	326	10,99	2,86
Geschlechtsorgane, männlich	204	16	220	7,41	1,93
Haut u. Anhangsorgane (ohne Mamma)	180	15	195	6,57	1,71
Atmungstrakt	143	700	843	28,41	7,40
ZNS	90	79	169	5,70	1,48
Geschlechtsorgane, weiblich	90	15	105	3,54	0,92
Leber, Gallengang u. -blase	83	703	786	26,49	6,90
Harntrakt	77	268	345	11,63	3,03

Lymphohämatopoetisches System

Tumore des blutbildenden Systems kamen hauptsächlich (primär?) multipel vor (Tabelle 4.1-10). Neben Hämangiosarkomen, die vor allem die Milz befielen, und Malignen Lymphomen (siehe auch Tabelle 4.1-51) waren häufig Karzinom-Metastasen in Lymphknoten zu finden. Bedingt durch die hohe Zahl von Meta-

Tabelle 4.1-10

Neoplasien des lymphohämatopoetischen Systems bei 1.152 Tumorträgern (Mehrfachnennungen)

	n	%	% aller Obduktionen
Solitäre Tumore	150	100	1,32
Knochenmark	4	2,67	0,04
Myeloische Leukose	2	-	0,02
Malignes Lymphom	1	-	0,01
Karzinometastase	1	-	0,01
Milz	73	48,67	0,64
Hämangiosarkom	56	-	0,49
Malignes Lymphom	15	-	0,13
Fibrosarkom	2	-	0,02
Lymphknoten	40	26,67	0,35
Malignes Lymphom	31	-	0,27
Karzinometastase	7	-	0,06
Mastzellentumor	2	-	0,02
Tonsille	21	14	0,18
Plattenepithel-Ca	14	-	0,12
Malignes Lymphom	3	-	0,03
Plasmazellentumor	1	-	0,01
Melanom	3	-	0,03
Thymus	12	8	0,11
Malignes Lymphom	11	-	0,1
Thymom	1	-	0,01
Multiples Vorkommen	1036	100	9,1
Sarkom	313	30,21	2,75
Hämangiosarkom	264	-	2,32
Fibrosarkom	34	-	0,3
Osteosarkom	11	-	0,1
Liposarkom	2	-	0,02
Chondrosarkom	2	-	0,02
Karzinom	353	34,07	3,1
aus Mamma	165	-	1,45
Sonstige Herkunft	188	-	1,65
Malignes Lymphom	275	26,54	2,42
Melanom	34	3,28	0,3
Blastom	22	2,12	0,19
Myeloische Leukose	20	1,93	0,18
Plasmazellentumor	17	1,64	0,15
Thymom	2	0,19	0,02

Tabelle 4.1-11

Rassenrisiko für Ausbildung solitärer Neoplasien des lympho-hämatopoetischen Systems, korrigiert um Metastasen

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Sennenhund, Berner	3	2,11	0,6	2,061	5,860	16,659
Deutsch Kurzhaar	2	1,41	0,4	1,495	5,410	19,574
Boxer	26	18,31	5,9	3,618	5,334	7,864
Bulldogge, Franz.	2	1,41	0,5	1,162	4,325	16,091
Hovawart	3	2,11	0,8	1,354	4,003	11,833
Afghane	4	2,82	1,3	1,276	3,319	8,636
Mix	34	23,94	31	Chi-Quadrat < 3,841		
DSH	30	21,13	23,3	Chi-Quadrat < 3,841		
Cocker Spaniel	13	9,15	8,5	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	13	9,15	14,9	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	12	8,45				
Summe	142	99,99				

Tabelle 4.1-12

Alters- und Geschlechtsverteilung bei Hunden mit solitären Neoplasien des lympho-hämatopoetischen Systems

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	6	4,08	m	94	63,51
2	4	7	4,76	mk	4	2,7
4	6	10	6,8	w	47	31,76
6	8	15	10,2	wk	3	2,03
8	10	27	18,37	Summe	148	100
10	12	37	25,17			
12	14	31	21,09			
14	16	10	6,8			
16	18	4	2,72			
Summe		147	100			

stasen in diesem Organsystem, überwiegend Karzinomen, ergab sich insgesamt ein Anteil von 39,97 % an allen Tumorträgern. Der Anteil autochthoner Geschwülste (n=728) in Organen des lymphohämatopoetischen Systems (6,39 % Anteil Sektionsgut, 24,54 % Anteil an allen Tumorträgern) ist in unserem Sektionsgut ähnlich dem in anderen Untersuchungen (Eskens 1983; Kusch 1985; Priester and McKay 1980). Neben möglichen Organtropismen spielen bei der Metastasierung in das lymphohämatopoetische System dessen Filterwirkung für Tumoremboli eine Rolle (Fajardo 1994; Poste and Fidler 1980; von Dewitz 1987).

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % zeigten Berner Sennenhund, Boxer, Deutsch Kurzhaar, Französische Bulldogge, Hovawart und Afghane im Berliner Sektionsgut ein besonders hohes Risiko, primäre Tumore des lymphohämatopoetischen Systems auszubilden (Tabelle 4.1-11). Das stimmt zumindestens was den Boxer betrifft mit anderen Untersuchern überein, die außer dem Boxer noch Basset, Bernhardiner, Scotch-Terrier, Bulldogge und Airedale-Terrier ein hohes Risiko für diese Tumoren zuweisen (Capurro, Buracco, and Rossi 1992; Couto 1985; Dorn, Taylor, and Hibbard 1967; Onion 1984; Priester and McKay 1980; Rallis et al. 1992).

Bei einem Altersdurchschnitt von $9,362 \pm 3,653$ Jahren sind in den Altersgruppen zwischen 10 und 14 Jahren etwa die Hälfte aller betroffenen Hunde zu finden (Tabelle 4.1-12). Damit treten diese Tumore in früheren Lebensalter auf als andere Tumore, wobei Rüden deutlich öfter lymphohämatopoetische Neoplasien zu entwickeln scheinen (Tabelle 4.1-12). Ähnliches berichten auch (Majzoub 1997; Parodi, Dargent, and Crespeau 1988; Priester and McKay 1980; Valli et al. 1981).

Atmungstrakt

Im nasopharyngealen Raum und in der Trachea gehörten Neoplasien zu den Seltenheiten (Tabelle 4.1-13). In Bronchien und Lunge waren mehr Metastasen als autochthonen Neoplasien zu sehen. Dabei waren Mammakarzinom-Metastasen „Spitzenreiter“. Unter den primären Tumoren spielten vor allem die *Bronchio-alveoläre Adenokarzinome* eine große Rolle (muzinöse Typen und Typen ohne Muzinbildung), wobei die sogenannten *Epidermoid-Karzinome*, die plattenepithelartige Strukturen und teilweise auch Pseudolumina ausbilden können, weniger häufig auftraten. *Adenokarzinome der Bronchialdrüsen* waren selten. Praktisch keine Rolle spielten Riesenzell-Karzinome.

Im Berliner Sektionsgut ist der **Atmungstrakt** wegen des hohen Aufkommens von Metastasen (Weiss 1984) das zweithäufigste von Neoplasien betroffene Organsystem.

Die **Nasenhöhle** mit ihren konsekutiven Sinus war mit 0,37 % aller Tumorfälle (entsprechend 0,10 % aller seziierten Hunde) nur sehr gering betroffen. Die von Hänichen und Schiefer (1968) mutmaßte besondere Bevorzugung der Nasenhöhle für Neoplasien beim Hund konnte in Berlin ebensowenig wie in Gießen (Eskens 1983) oder München (Kusch 1985) verifiziert werden. Neoplasien der Nasen- und Nebenhöhlen waren zumeist *Adenokarzinome*, was mit Angaben des Schrifttums übereinstimmt (Evans et al. 1989; Hayes, Wilson, and Fraumeni 1982; Norris 1979; Patnaik 1989; Patnaik et al. 1984). Neuroepitheliale Neubildung in der Nasenhöhle gehörten nicht nur im Berliner Sektionsgut zu extremen

Raritäten beim Hund (Mattix et al. 1994; Schwartz-Porsche et al. 1992; Seeliger and Welzien 1992).

Primäre Karzinome der **Lunge** (n=131) waren bei 1,15 % der obduzierten Hunde zu finden (4,42 % aller Tumore). Dies ist mit den etwa 1% von Brodey (1970b) und von Brodey und Craig (1965) vergleichbar. Dahme (1968), Eskens (1983) und Kusch (1985) weisen dagegen nur eine Inzidenz zwischen 0,25 und 0,6 % nach. Als primäre Tumoren der Lunge kommen hauptsächlich Adenokarzinomen vor (Brodey and Craig 1965; Miles 1988; Miles et al. 1990; Ogilvie et al. 1989; Prange et al. 1988; Stünzi 1973; Taylor et al. 1979). Die in der Literatur mitgeteilte hohe Inzidenz für Adenokarzinome (Evans et al. 1989; Hayes, Wilson, and Fraumeni 1982; Madewell et al. 1976) und die niedrigere für Sarkome (Geisel 1980; Patnaik 1989; Patnaik et al. 1984) bestätigt unsere Ergeb-

Tabelle 4.1-13
Neoplasien des Atmungsapparates bei 780 Tumorträgern

	n	%	% Gesamtmaterial
Nasenhöhle	11	100	0,10
Adenokarzinom	8	72,73	0,07
Fibrosarkom	1	9,09	0,01
Anaesthesiom	1	9,09	0,01
Osteosarkom	1	9,09	0,01
Pharynx	2	100	0,02
Melanom	1	50	0,01
Plattenepithelkarzinom	1	50	0,01
Trachea	3	100	0,03
Adeno-CA der Schilddrüse	3	100	0,03
Bronchien/Lunge	827	100	7,26
Adeno-Ca Lunge/Bronchien	128	15,48	1,12
Solitäres Hämangiosarkom	2	0,24	0,02
Solitäres Malignes Lymphom	1	0,12	0,01
Mammakarzinom-Metastasen	215	26,00	1,89
Sonstige Karzinom-Metastasen	149	18,02	1,31
Hämangiosarkom	162	19,59	1,42
Malignes Lymphom	45	5,44	0,40
Fibrosarkom	34	4,11	0,30
Osteosarkom	26	3,14	0,23
Blastome	15	1,81	0,13
Mastzellentumor	8	0,97	0,07
Chondrosarkom	5	0,60	0,04
Mesotheliom	4	0,48	0,04
Myeloische Leukose	3	0,36	0,03
Sonstige	30	3,63	0,26

Tabelle 4.1-14
Rassenrisiko für Ausbildung primärer Lungentumore

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Terrier, alle	6	4,69	13,8	0,89	0,403	0,182
Mix	29	22,66	26,4	Chi-Quadrat < 3,841		
DSH	21	16,41	19,9	Chi-Quadrat < 3,841		
Pudel	13	10,16	10,3	Chi-Quadrat < 3,841		
Cocker Spaniel	9	7,03	7,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	8	6,25	12,7	Chi-Quadrat < 3,841		
Boxer	5	3,91	5,1	Chi-Quadrat < 3,841		
Schnauzer, alle	5	3,91	3	Chi-Quadrat < 3,841		
Rottweiler	4	3,13	3,7	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	28	21,88				
Summe	128	100				

Tabelle 4.1-15
Altersgruppen und Geschlechtsverteilung der Hunde mit primären Lungentumoren

Altersgruppe in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	3	2,54	m	37	30,83
2	4	1	0,85	mk	2	1,67
4	6	2	1,69	w	71	59,17
6	8	10	8,47	wk	10	8,33
8	10	20	16,95	Summe	120	100
10	12	33	27,97			
12	14	28	23,73			
14	16	17	14,41			
16	18	4	3,39			
Summe		118	100			

nisse. Von den insgesamt 827 in der Lunge gefundenen Neoplasien waren allerdings 84,2 % (n=696) Metastasen, von denen wiederum 215 von Mammakarzinomen abstammten (das sind 30,9 % aller Metastasen in der Lunge). Dieses Ergebnis bestätigt, daß entsprechend ihrem Kapillarbett die Lunge eines der bedeutendsten Metastasenorgane ist (Miles et al. 1990; Prange et al. 1988; Reif and Cohen 1971; Rosenbruch and Klein 1980; von Dewitz 1987).

Rein rechnerisch scheinen nur Terrierschläge ein erhöhtes Risiko für primäre Lungentumore aufzuweisen (Tabelle 4.1-14), während andere Untersucher eine deutliche Disposition des Boxers postulieren (Brodey and Craig 1965; Kusch 1985).

Die von primären Lungentumoren betroffenen Tiere hatten ein Durchschnittsalter von $10,576 \pm 3,149$ Jahre, wobei über 50 % der Tumore in der Altersgruppe zwischen 10 und 14 Jahren lagen (Tabelle 4.1-15). Damit traten im Berliner Sektionsgut Tumore bei jüngeren Tieren auf als bei anderen Untersuchern (Eskens 1983; Hahn, Muggenburg, and Griffith 1996; Kusch 1985). Weibliche Tiere waren wie in anderen Untersuchungen (Kusch 1985; Nielsen and Horava 1960) insgesamt in der Überzahl (Tabelle 4.1-15); lediglich Prange et al. (1988) sehen ein höheres Risiko für männliche Tiere.

Leber und Gallenblase

Entsprechend ihrer Filterfunktion ist die Leber ähnlich wie Lunge und lymphohämatopoetisches System häufig von Metastasen betroffen (Tabelle 4.1-16). Neben primär multiplen oder metastasierten Hämangiosarkomen und Malignen Lymphomen sind in der Leber Karzinom-Metastasen und dabei wiederum solche der Mamma bedeutsam. Als autochthone Tumore konnten hepatozelluläre Adenokarzinome, cholangiäre Adenokarzinome, Mischtumoren aus beiden vorstehenden Neoplasien und Adenokarzinome der Gallenblase beobachtet werden;

Tabelle 4.1-16
Neoplasien von Leber und Gallenwegen bei 782 Tumorträgern

	n	%	% aller Obduktionen
Solitäre Tumore	111	100	0,97
Hepatozelluläres Karzinom	43	38,74	0,38
Gallengangsadeno-karzinom	31	27,93	0,27
Gallenblasen-Adeno-karzinom	7	6,31	0,06
Hepatoz. u. cholangiäres Adeno-karzinom	2	1,80	0,02
Solitäres Hämangiosarkom	23	20,72	0,20
Malignes Lymphom	3	2,70	0,03
Komplexes Sarkom	2	1,80	0,02
Metastasen/primär multipel	675	100	5,93
Hämangiosarkom	228	33,78	2,00
Karzinom-Metastase	196	29,04	1,72
Malignes Lymphom	162	24,00	1,42
Fibrosarkom	35	5,19	0,31
Myeloische Leukose	16	2,37	0,14
Blastom	14	2,07	0,12
Komplexes Sarkom	9	1,33	0,08
Insulinom	6	0,89	0,05
Melanom	5	0,74	0,04
Erythro-se	3	0,44	0,03
Maligne Histiozytose	1	0,15	0,01

diese wurden bei 0,73 % aller sezierter Hunde und bei 2,8 % aller Tumorträger festgestellt. Dieses Ergebnis bestätigt die Erhebungen von Bastianello (1983), Patnaik et al. (1980; 1981a; 1981b) und Kusch (1985), zeigt aber eine geringere Prävalenz als bei Eskens (1983) und bei von Sandersleben (1973) berichtet wird.

Ein Rassenrisiko scheint für Pudel, Cocker Spaniel und Teckel zu bestehen, während Terrier signifikant „unempfindlich“ für Leberkarzinome zu sein scheinen (Tabelle 4.1-17). Während die meisten Untersucher keiner Rasse eine Prä-

Tabelle 4.1-17

Rassenrisiko für hepatozelluläre, cholangiäre und Gallengangs-Adenokarzinomen

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Pudel	14	16,87	6,7	1,338	2,346	4,114
Cocker Spaniel	9	10,84	4,7	1,035	2,047	4,049
Teckel	15	18,07	8,2	1,163	2,018	3,502
Terrier	3	3,61	9	0,104	0,308	0,915
Mix	15	18,07	17,1	Chi-Quadrat < 3,841		
DSH	12	14,46	12,9	Chi-Quadrat < 3,841		
Boxer	4	4,82	3,3	Chi-Quadrat < 3,841		
Beagle	2	2,41	1	Chi-Quadrat < 3,841		
Collie	2	2,41	0,9	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	7	8,43				
Summe	83	100				

dominanz zuordnen können, berichtet Kusch (1985) ebenso über eine deutliche

Tabelle 4.1-18

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit hepatozellulären und cholangiären Adenokarzinomen (n=83).

Altersgruppen (J.)						
Von ()	bis (<)	n	%	Geschlecht	n	%
0	2	0	0	m	27	33,33
2	4	1	1,25	mk	2	2,47
4	6	1	1,25	w	46	56,79
6	8	8	10	wk	6	7,41
8	10	9	11,25	Summe	81	100
10	12	22	27,5			
12	14	25	31,25			
14	16	9	11,25			
16	18	5	6,25			
Summe		80	100			

Bevorzugung des Pudels.

Das Durchschnittsalter der Hunde mit hepatozellulären, cholangiären und Gallenblasen-Adenokarzinomen betrug $11,163 \pm 2,767$ Jahre, wobei in der Altersgruppe zwischen 10 und 14 Jahren über 50 % der betroffenen Tiere anzutreffen waren. Weibliche Tiere waren deutlich häufiger betroffen als Rüden (Tabelle 4.1-18). Das Durchschnittsalter stimmt mit den Angaben Patnaiks et al. (Patnaik et al. 1981a; 1981b) überein, während Kusch (1985) jüngere Tiere sah.

Tabelle 4.1-19

Neoplasien der Haut im Sektionsgut und Anhangsorgane (ohne Mamma) bei 195 Tumorträgern

	n	%	% aller Obduktionen
Haut	153	100	1,34
Mastzellentumor	34	22,22	0,30
Fibrosarkom	29	18,95	0,25
Adenokarzinom	23	15,03	0,20
Malignes Lymphom	15	9,80	0,13
Hämangiosarkom	12	7,84	0,11
Melanom	11	7,19	0,10
Plattenepithelkarzinom	11	7,19	0,10
Chondrosarkom	3	1,96	0,03
Komplexes Sarkom	3	1,96	0,03
Liposarkom	3	1,96	0,03
Maligne Histiozytose	2	1,31	0,02
Osteosarkom	2	1,31	0,02
Plasmozytom	2	1,31	0,02
Trichokarzinom	2	1,31	0,02
Basalzellentumor	1	0,65	0,01
Zehe	20	100	0,18
Plattenepithelkarzinom	11	55,00	0,10
Melanom	5	25,00	0,04
Fibrosarkom	2	10,00	0,02
Osteosarkom	1	5,00	0,01
Hämangiosarkom	1	5,00	0,01
Perianalgebiet	22	100	0,19
Adenokarzinom hepatoider Drüsen	17	77,27	0,15
Analbeutelkarzinom	2	9,09	0,02
Fibrosarkom	2	9,09	0,02
Melanom	1	4,55	0,01

Haut und Hautanhangsorgane

In diesen Kompartimenten standen im Sektionsgut eindeutig die Neoplasien der Mamma (n = 413) vor denen der Haut (n = 153), des perianalen Bereichs (n = 22) oder der Zehe (n = 20) im Vordergrund (Tabelle 4.1-19 und Tabelle 4.1-20). Zusammengefaßt waren damit 20,49 % aller beobachteten Tumore (Mamma: 13,9 %; Haut, Perianalbereich und Zehe: 6,6 %) der Haut und deren Anhangsorganen zuzuordnen; das entspricht einem Anteil von 5,34 % an allen seziierten Hunden.

Betrachtet man nur die Haut ohne Anhangsorgane so waren (bei n=153 Sektionen) 64,71 % der Neoplasien mesenchymaler, 28,1 % epithelialer und 7,19 % neuroektodermaler Herkunft. Schließt man die Neoplasien der Zehen und des Perianalbereichs ein, verändern sich die Verhältnisse in Richtung epithelial: es waren dann 53,9 % mesenchymaler, 35,9 % epithelialer und 10,3 % neuroektodermaler Herkunft.

Im Vergleich mit der Literatur ähnelt das Berliner Ergebnis für „reine“ Hauttumoren (Anteil von 1,34 % am Sektionsgut; 5,16 % aller Tumorträger) den Ergebnissen von Eskens (1983), Frese, Eskens und Frank (1982) und Weiße (1967).

Betrachtet man das Rassenrisiko getrennt für Haut, Zehe und Perianalbereich ergaben sich folgende Befunde (Tabelle 4.1-20, Tabelle 4.1-21, Tabelle 4.1-22): Während in der Haut Riesenschnauzer, Boxer und Cocker Spaniel die Rassen mit dem höchsten Risiko für Neoplasien zu sein scheinen, ist im Perianalbereich nur eine Disposition für Cocker Spaniel und bei Tumoren der Zehe eine für Rie-

Tabelle 4.1-20
Rassenrisiko für Neoplasien der Haut (ohne Perianal- und Zehenbereich)

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Schnauzer, Riesen-	4	2,61	1,4	1,178	3,082	8,063
Boxer	13	8,50	6,1	1,307	2,289	4,009
Cocker Spaniel	18	11,76	8,6	1,393	2,263	3,675
Terrier, insgesamt	5	3,27	16,5	0,636	0,276	0,12
Mix	35	22,88	31,6	Chi-Quadrat < 3,841		
DSH	20	13,07	23,8	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	16	10,46	15,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Pudel	13	8,50	12,3	Chi-Quadrat < 3,841		
Beagle	3	1,96	1,9	Chi-Quadrat < 3,841		
Rottweiler	3	1,96	4,4	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	23	15,03				
Summe	153	100				

senschnauzer und Pudel festzustellen.

Tabelle 4.1-21
Rassenrisiko für Ausbildung von Neoplasien der Zehen

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Schnauzer, Riesen-	5	25	0,2	20,958	39,135	73,077
Pudel	4	20	1,6	1,007	2,873	8,200
DSH	4	20	3,1	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	2	10	2	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	5	25				
Summe	20	100				

Tabelle 4.1-22
Rassenrisiko für Ausbildung von Neoplasien des Perianalbereichs

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Cocker Spaniel	6	27,27	1,2	2,778	6,316	14,359
DSH	3	13,64	3,4	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	3	13,64	2,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Mix	2	9,09	4,5	Chi-Quadrat < 3,841		
Pudel	2	9,09	1,8	Chi-Quadrat < 3,841		
Terrier	2	9,09	2,4	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	4	18,18				
Summe	22	100				

Die in Berlin feststellbare Disposition des Boxers für Hauttumoren, wird durch die Ergebnisse von vielen Untersuchern bestätigt (Cohen et al. 1974; Er and Sutton 1989; Eskens 1983; Kusch 1985). Das errechnete Risiko für Neoplasien der Zehen bei Riesenschnauzer und Pudel spiegelt die Ergebnisse von Frese, Frank und Eskens (1983) wieder, während Brewer et al. (1993) den Golden Retriever als gefährdete Rasse beschrieben. Daß bei Cocker Spaniel deutlich mehr Perianaldrüsentumore auftreten können, haben bereits Nielsen und Aftosmis (1964) festgestellt.

Die Altersverteilungen für Neoplasien der Haut (Tabelle 4.1-23), der Zehen (Tabelle 4.1-24) und des Perianalbereichs (Tabelle 4.1-25) zeigten, daß mehr Perianaltumoren (\bar{O} 12,000 \pm 2,737 Jahre) bei älteren Hunden beobachtet werden können als Tumoren der Haut (\bar{O} 10,858 \pm 2,979 Jahre) oder der Zehe (\bar{O} 10,211 \pm 2,936 Jahre). Diese Tendenz findet sich gleichermaßen bei anderen Untersuchern, auch wenn die Altersdurchschnitte in Berlin höher liegen (Brodey 1970b;

Eskens 1983; Goldschmidt and Shofer 1992; Kusch 1985).

Im Berliner Material schien keine Geschlechtsdisposition für Hauttumoren vorhanden zu sein, jedoch dominierten bei Zehen- und Perianaltumoren eindeutig Rüden. Im Gegensatz dazu wird eine Geschlechtsdisposition von Tumoren der Zehe in der Literatur verneint (Brewer et al. 1993; Carpenter et al. 1991; Frese, Frank, and Eskens 1983), während über einen Zusammenhang zwischen männlichem Geschlecht und Ausbildung von Perianaltumoren in vielen Untersuchungen berichtet wird (Brodey 1970b; Er and Sutton 1989; Hayes and Wilson 1977; Kusch 1985; Nielsen and Aftosmis 1964; Priester 1973; Priester and

Tabelle 4.1-23

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit Neoplasien der Haut (ohne Zehen- und Perianalbereich)

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	3	2,03	m	72	47,06
2	4	1	0,68	mk	5	3,27
4	6	3	2,03	w	69	45,1
6	8	10	6,76	wk	7	4,58
8	10	26	17,57	Summe	153	100
10	12	40	27,03			
12	14	41	27,7			
14	16	17	11,49			
16	18	7	4,73			
Summe		148	100			

Tabelle 4.1-24

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit Neoplasien der Zehen

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	0	0	m	16	80
2	4	0	0	mk	1	5
4	6	0	0	w	2	10
6	8	5	26,32	wk	1	5
8	10	1	5,26	Summe	20	100
10	12	7	36,84			
12	14	4	21,05			
14	16	1	5,26			
16	18	1	5,26			
Summe		19	100			

Tabelle 4.1-25

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit Neoplasien des Perianalbereichs

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	0	0			
2	4	0	0			
4	6	0	0			
6	8	1	4,55			
8	10	3	13,64			
10	12	5	22,73			
12	14	9	40,91			
14	16	1	4,55			
16	18	3	13,64			
Summe		22	100			

Geschlecht		
Geschlecht	n	%
m	15	68,18
mk	1	4,55
w	5	22,73
wk	1	4,55
Summe	22	100

Tabelle 4.1-26

Neoplasien der Mamma im Sektionsgut bei 413 Tumorträgerinnen (Metastasen mit Mehrfachnennungen)

	n	%	% aller Obduktionen
Mammatumore	413	100	3,63
Adenokarzinom	229	55,45	2,01
Komplexes Adenokarzinom	82	19,85	0,72
Solides Karzinom	65	15,74	0,57
Anaplastisches Karzinom	17	4,12	0,15
Karzinom Sarkom	15	3,63	0,13
Malignes Lymphom	2	0,48	0,02
Mastzellentumor	2	0,48	0,02
Myoepithelkarzinom	1	0,24	0,01
davon mit Metastasierung	280	67,8	2,46
Metastasen in:	n	% von 280 Hunden	
Lunge	208	74,29	1,83
Lymphknoten	157	56,07	1,38
Leber	56	20,00	0,49
Milz	32	11,43	0,28
Niere	22	7,86	0,19
Haut	17	6,07	0,15
Pleura	16	5,71	0,14
Gehirn	15	5,36	0,13
Herz	14	5,00	0,12
Muskulatur	7	2,50	0,06
Peritoneum	7	2,50	0,06
Knochen	6	2,14	0,05
Mediastinum	6	2,14	0,05
Nebennieren	6	2,14	0,05
Uterus	4	1,43	0,04
Wirbelsäule	3	1,07	0,03
Harnblase	1	0,36	0,01
Hypophyse	1	0,36	0,01

McKay 1980; Rosenberg et al. 1991; Wilson and Hayes 1979).

Die Häufigkeit von Mammatumoren im Berliner Sektionsgut lag mit einem Anteil von 3,63 % (13,92 % aller Tumoren) ähnlich hoch wie bei Kusch (1985) und übertrifft damit die Angaben anderer Untersucher (Bastianello 1983; Eskens 1983; Ferguson 1985; Sasco 1991; von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973). Bei Mammatumoren (Tabelle 4.1-26) sind im Sektionsgut Adenokarzinome die häufigsten Entitäten (55,45 % aller Mammatumoren). Komplexe Adenokarzinome (19,85 %) und solide Karzinome (15,74 %) werden seltener beobachtet. Bei 280 Tieren (67,8 %) wurden Metastasen beobachtet, die nur bei 98 Tieren (35 % aller Tiere mit Metastasen) als Einzelmetastasen auftraten: ausschließlich in der Lunge bei 55, allein im Lymphknoten bei 40 und allein in der Leber bei 3 Tieren. Ansonsten wurden Metastasierungen in mehreren Organen beobachtet, wobei bei 74,29 % dieser Tiere Metastasen in der Lunge und bei 56,07 % Metastasen in den regionären Lymphknoten zu finden waren. Metastasen in Leber, Milz und Nieren waren bei 39,92 % aller Tumorträger zu finden, und bei 36,78 % der Tiere saßen Metastasen in Haut, Pleura, Gehirn, Herz, Muskulatur, Peritoneum, Knochen, Mediastinum, Nebennieren, Uterus, Wirbelsäule, Harnblase und/oder Hypophyse. Die beobachtete hohe Metastasierungsrate bei Mammatumoren bestätigt die Untersuchung von Dewitz (1987). Über eine hohe Anzahl von Tieren mit Lungenmetastasen wird beispielsweise auch von Yamagani et al. (1996b) sowie von Fidler and Brodey (1967) berichtet. Letztere schließen daraus auf einen venösen Metastasierungsweg; unberücksichtigt bleiben bei diesen Überlegungen allerdings nicht untersuchte Lymphknoten und Lymphknoten mit okkulten Metastasen (Busch 1993; Raymond and Leong 1989).

Tabelle 4.1-27

Rassenrisiko für Ausbildung von Mammatumoren im Sektionsgut (n=413)

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Cocker Spaniel	55	13,32	23,3	2,042	2,714	3,607
Terrier, Airedale-	5	1,21	2,1	1,057	2,574	6,266
Pudel, insgesamt	58	14,04	33,2	1,457	1,931	2,558
Mix	115	27,85	85,2	1,212	1,509	1,878
DSH	40	9,69	64,2	0,414	0,573	0,794
Terrier, Yorkshire-	8	1,94	21,6	0,179	0,35	0,686
Rottweiler	2	0,48	11,9	0,047	0,159	0,537
Teckel	51	12,35	40,9	Chi-Quadrat < 3,841		
Boxer	16	3,87	16,4	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	63	15,25				
Summe	413	100				

Ein deutlich hohes Risiko für Mammatumoren war beim Cocker Spaniel, Airedale-Terrier, Pudel und bei Mischlingsrassen zu beobachten, während der Deutsche Schäferhund, ebenso wie Yorkshire-Terrier und Rottweiler ein deutlich geringeres Risiko aufwiesen (Tabelle 4.1-27). Die mutmaßliche Disposition des Teckels für Mammatumore (Eskens 1983; Kusch 1985; von Bomhard and Dreiack 1977; von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973) konnte in Berlin nicht verifiziert werden. Die festgestellte Disposition von Cocker Spaniel, Airedale-Terrier und Pudel bestätigt vergleichbare Literaturangaben (Frese 1985; Kusch 1985; MacVean et al. 1978; Zaninovic and Simcic 1994).

61,37 % aller Fälle fanden sich in der Altersgruppe von 10 bis 12 Jahren, bei einem Altersdurchschnittswert von $10,567 \pm 3,149$ Jahren. Die weitaus meistens Fälle betrafen intakte Hündinnen, in lediglich 7,02 % waren kastrierte Hündinnen betroffen (Tabelle 4.1-28). Die Alters- und Geschlechtsverteilung bestätigt Ergebnisse der Literatur (Boldizsár et al. 1992; Eskens 1983; Fidler and Brodey 1967; Frese 1985; Kurzman and Gilbertson 1986; Kusch 1985; Moulton 1990b; von Bomhard and Dreiack 1977; Zaninovic and Simcic 1994). Die geringe Zahl an kastrierten Hündinnen läßt an einen ovariellen Einfluß bei der Tumorgenese denken (Donnay, Raus, and Verstegen 1994; Misdorp 1988; Yamagami et al. 1996a).

Anders als bei den seziierten Hunden spielten bei den **Biopstaten** Neoplasien der Haut die Hauptrolle (Tabelle 4.1-29): 5.456 Biopsien von 8.618 Hunden wiesen Neoplasien auf (63,3 %), wobei 2.462 Hunde Hauttumoren (45,12 % aller Tumore, 28,57 % aller Biopsien) und 1.962 Hunde Mammatumoren (35,96 % aller Tumore, 22,77 % aller Biopsien) aufwiesen. Dabei dominierten bei den Hauttumoren epitheliale Neoplasien mit 67,57 % die mesenchymalen (26,51 %), wäh-

Tabelle 4.1-28

Alters- und Geschlechtsverteilung bei Mammatumoren im Sektionsgut (n=413)

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	2	0,49	w	384	92,98
2	4	0	0	wk	29	7,02
4	6	3	0,73	Summe	413	100
6	8	19	4,65			
8	10	44	10,76			
10	12	109	26,65			
12	14	142	34,72			
14	16	75	18,34			
16	18	15	3,67			
Summe		409	100,01			

Tabelle 4.1-29
Neoplasien der Haut im Biopatgut (1980–1995)

	n	%	%
Mesenchymale Neoplasien	1.983	38,5	100
Histiozytom	553	10,74	27,9
Mastzellentumor	493	9,58	24,9
Fibrosarkom	325	6,31	16,4
Lipom	203	3,94	10,2
Hämangiom	89	1,73	4,49
Hämangiosarkom	79	1,53	3,98
Fibrom	70	1,36	3,53
Sonstiges Sarkom	56	1,09	2,82
Liposarkom	32	0,62	1,61
Malignes Lymphom	32	0,62	1,61
Blastom	21	0,41	1,06
Myxosarkom	12	0,23	0,61
Stickersarkom	8	0,16	0,4
Osteosarkom	8	0,16	0,4
Neurofibrom	2	0,04	0,1
Epitheliale Neoplasien	2.653	51,5	100
Tumor hepatoider Drüsen	608	11,81	22,9
davon: Adenom hepatoider Drüsen	582	11,31	21,9
Adenokarzinom hepatoider Drüsen	26	0,51	0,98
Basalzellentumor	514	9,98	19,4
Talgdrüsentumor	384	7,46	14,5
davon: Talgdrüsenadenom	371	7,21	14
Talgdrüsenadenokarzinom	13	0,25	0,49
Haarfollikeltumor	317	6,16	12
davon: Trichoepitheliom	194	3,77	7,31
Nekrotisierendes u. verkalkendes Epitheliom (E. Malherbe)	123	2,39	4,64
Plattenepithelkarzinom	310	6,02	11,7
Intrakutan verhornendes Epitheliom	243	4,72	9,16
Papillom	182	3,54	6,86
Schweißdrüsentumor	89	1,73	3,35
davon: Zystadenom apokriner Schweißdrüsen	29	0,56	1,09
Solides Karzinom	23	0,45	0,87
Tubuläres Karzinom	14	0,27	0,53
Papilläres Syringadenom	13	0,25	0,49
Papilläres Karzinom	9	0,17	0,34
Spiradenom	1	0,02	0,04
Adenokarzinom des Analbeutels	6	0,12	0,23
Neuroektodermale Neoplasien	512	9,95	100
Melanom	512	9,95	100
Summe	5.148	100	

rend von neuroektodermalen Neoplasien nur Melanome diagnostiziert wurden (5,93 %). Von mesenchymalen Tumoren waren hauptsächlich *Histiozytome*, *Mastzellentumore* und *Fibrosarkome* zu beobachten; bei den epithelialen standen die *Tumoren hepatoider Drüsen* an der Spitze (11,86 %) gefolgt von *Talg* -

drüsentumoren (6,95 %). Danach kamen *Basalzellentumore* (5,79 %), *Plattenepithelkarzinome* (5,44 % und *Haarfollikeltumore* (4,81 %). Erst danach waren *intrakutan verhornende Epitheliome* (3,67 %) und *Papillome* (2,21 %) zu finden.

Da die Haut und deren Adnexen als eines der größten Organsysteme der visuellen Inspektion von Tierarzt und Tierbesitzer am einfachsten zugänglich ist, zählen Neoplasien der Haut und deren Anhangsgebilden mit zu den am frühesten und am häufigsten diagnostizierten Geschwülste in Klinik- und Biopsiestatistiken (Bostock 1986; Brodey 1970b; Cohen et al. 1974; Dorn et al. 1966; Goldschmidt and Shofer 1992; MacVean et al. 1978); in Sektionsstatistiken dominieren meist andere Neoplasien (Bastianello 1983; Eskens 1983; Kusch 1985; Sedelmeier and Weiss 1963; von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973). In den schon erwähnten Untersuchungen aus Alameda und Contra Costa Counties in Californien war die Inzidenz allerdings höher als im Berliner Biopsiegut und betrafen 67,6% aller Neoplasiefälle die Haut (Dorn et al. 1966; Dorn et al. 1968a; Dorn et al. 1968b), in der Untersuchung von Goldschmidt and Shofer (1992) waren es 45 %.

An mesenchymalen Hauttumoren fanden sich im Berliner Biopsiematerial bevorzugt Histiocytoide, Mastzellentumore und Fibrosarkome, während bei Goldschmidt and Shofer (1992) die Reihung Histiocytoide, Mastzellentumor und Lipom war. An epithelialen Neoplasien konnten in Berlin Adenome hepatoider Drüsen, Basalzellentumoren und Talgdrüsenadenome am häufigsten beobachtet werden, während Goldschmidt and Shofer (1992) Adenome hepatoider Drüsen, Talgdrüsenadenome und Trichoepitheliome an erster Stelle sahen. Bastianello (1983) wiederum sieht in ihrem Untersuchungsgut die Reihung Basalzellentumore, Plattenepithelkarzinome, Adenome hepatoider Drüsen und Melanome.

Harntrakt

Neoplasien der Harnorgane waren nur selten zu sehen (Tabelle 4.1-30). Der Anteil der Tumore der Harnorgane (inkl. Metastasen) von 3,03 % (n=345) am Sektionsgut zeigte eine niedrige Inzidenz; für primäre Tumore der Harnblase (n=37) und der Niere (n=40) ergab sich ein Anteil von 0,68 % am Sektionsgut (2,6 % am Tumormaterial); dies liegt innerhalb der Ergebnisse (0,3-1,5 %) anderer Untersucher (Baskin and De Paoli 1977; Dorn et al. 1968a; Kusch 1985; Lucke and Kelly 1976).

In der **Harnblase** kamen am häufigsten Übergangszell-Karzinome (Urothelkarzinome) vor, die teilweise papillär aufgebaut waren aber auch Plattenepithel- und Drüsenelemente aufwiesen; dies entspricht den Ergebnissen etlicher Untersuchungen (Brearley, Cooper, and Wedderburn 1986; Burnie and Weaver

Tabelle 4.1-30
Neoplasien von Harnblase und Nieren bei 330 Tumorträgern

	n	%	% aller Obduktionen
Harnblase, insgesamt	53	100	0,47
Urothelkarzinom	22	41,51	0,19
Adenokarzinom	7	13,21	0,06
Papillom	3	5,66	0,03
Entdifferenziertes Karzinom	2	3,77	0,02
Fibrosarkom	1	1,89	0,01
Entdifferenziertes Sarkom	1	1,89	0,01
Hämangiosarkom	1	1,89	0,01
Summe Harnblase	37	69,81	0,32
Metastasen/primär multipel			
Prostatakarzinom	7	13,21	0,06
Malignes Lymphom	5	9,43	0,04
Hämangiosarkom	2	3,77	0,02
Fibrosarkom	2	3,77	0,02
Summe Metastasen	16	30,19	0,14
Niere, insgesamt	292	100	2,56
Nierenzellkarzinom	21	7,19	0,18
Nephroblastom	5	1,71	0,04
Solitäres Hämangiosarkom	5	1,71	0,04
Urothelkarzinom	3	1,03	0,03
Malignes Lymphom	3	1,03	0,03
Adenom	2	0,68	0,02
Fibrosarkom	1	0,34	0,01
Summe Niere	40	13,7	0,35
Metastasen/primär multipel			
Malignes Lymphom	67	22,95	0,59
Hämangiosarkom	63	21,58	0,55
Mammakarzinom	25	8,56	0,22
Leber-/Gallengangskarzinom	19	6,51	0,17
Lungenadenokarzinom	13	4,45	0,11
Fibrosarkom	12	4,11	0,11
Melanom	11	3,77	0,10
Nebennierenadenokarzinom	11	3,77	0,10
Prostatakarzinom	6	2,05	0,05
Plasmazellentumor	5	1,71	0,04
Mastzellentumor	5	1,71	0,04
Osteosarkom	5	1,71	0,04
Leiomyosarkom	4	1,37	0,04
Übergangsepithelkarzinom	2	0,68	0,02
Paragangliom (Phäochromozytom)	2	0,68	0,02
Plattenepithelkarzinom	1	0,34	0,01
Malignes Histiozytom	1	0,34	0,01
Summe Metastasen	252	86,3	2,21

Tabelle 4.1-31
Rassenrisiko für solitäre Nierentumore im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
DSH	11	27,5	6,2	1,046	2,066	4,082
Mix	11	27,5	8,3	Chi-Quadrat < 3,841		
Pudel	5	12,5	3,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	3	7,5	4	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	10	25				
Summe	40					

1983; Crow 1985; Krawiec 1991; Norris et al. 1992; Schwarz and Willer 1989; Valli et al. 1995).

In der **Niere** wurden eigenständige Tumore (meistens Nierenzell-Karzinome, die papillär/tubulär aufgebaut sind, und weniger häufig Nephroblastome) eher selten beobachtet; eine große Rolle spielten in der Niere allerdings wieder systemische Neoplasien wie Maligne Lymphome oder Hämangiosarkome sowie Metastasen von Karzinomen. Das ist in Übereinstimmung mit Literaturmitteilungen (Baskin and De Paoli 1977; Bastianello 1983; Hayes and Fraumeni 1977; Klein et al. 1988; Kusch 1985).

In Übereinstimmung mit Kusch (1985) scheint nur der Deutsche Schäferhund ein erhöhtes Risiko für Nierentumore zu tragen (Tabelle 4.1-31). Hayes und Fraumeni (1977) sowie Klein et al. (1988) verneinen allerdings prinzipiell eine Rassendisposition.

Tabelle 4.1-32
Alters- und Geschlechtsverteilung bei solitären Nierentumoren im Sektionsgut

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht	n	%
Von ()	bis (<)					
0	2	0	0	m	22	57,89
2	4	0	0	mk	1	2,63
4	6	3	8,33	w	13	34,21
6	8	3	8,33	wk	2	5,26
8	10	10	27,78	Summe	38	100
10	12	8	22,22			
12	14	10	27,78			
14	16	2	5,56			
16	18	0	0			
Summe		36	100			

Die Tiere mit primären/solitären Nierentumoren wiesen mit $10,0 \pm 2,586$ Jahren einen etwas niedrigeren Altersdurchschnitt als alle Hunde mit Neoplasien auf, wobei vornehmlich männliche Tiere betroffen waren (Tabelle 4.1-32). Über eine Überrepräsentation von Rüden bei Nierentumoren wird vielfach berichtet (Baskin and De Paoli 1977; Hayes and Fraumeni 1977; Klein et al. 1988; Nielsen and Moulton 1990). Lediglich Norris et al. (1992) können trotz leichter Dominanz von Rüden in ihrem Klinikmaterial keine Disposition ausmachen, während Kusch (1985) und auch Wilson et al. (1979) nur bei Tumoren der harnableitenden Wege eine eindeutige Disposition der Hündinnen postulieren.

Männliche Geschlechtsorgane

Im männlichen Geschlechtstrakt (Tabelle 4.1-33) standen Neoplasien der Keimdrüsen mengenmäßig vor den Prostata- und Penistumoren. Mit 137 Fällen hatten 1,2 % aller sezierten Hunde (2,25 % aller sezierten Rüden) **Hodentumore**.

Tabelle 4.1-33

Neoplasien des männlichen Geschlechtsapparates bei 206 Tumorträgern

	n	%	% aller Obduktionen
Hoden	137	100	1,2
Leydig	47	34,31	0,41
Seminom	44	32,12	0,39
Sertoli	27	19,71	0,24
Malignes Lymphom	5	3,65	0,04
Seminom und Leydig	4	2,92	0,04
Embryonales Karzinom	3	2,19	0,03
Leydig und Sertoli	1	0,73	0,01
Seminom und Sertoli	2	1,46	0,02
Seminom/Leydig/Sertoli	2	1,46	0,02
Hämangiosarkom	1	0,73	0,01
Melanom	1	0,73	0,01
Prostata	64	100	0,56
Adenokarzinom	49	76,56	0,43
Fibrosarkom	2	3,13	0,02
Hämangiosarkom	3	4,69	0,03
Malignes Lymphom	2	3,13	0,02
Melanom	2	3,13	0,02
Leiomyom	2	3,13	0,02
Fibrom	1	1,56	0,01
Blastom	3	4,69	0,03
Penis	19	100	0,17
Plattenepithelkarzinom	9	47,37	0,08
Hämangiosarkom	4	21,05	0,04
Stickersarkom	3	15,79	0,03
Melanom	1	5,26	0,01
Malignes Lymphom	1	5,26	0,01
Fibrosarkom	1	5,26	0,01

Damit hatten diese Tumoren einen Anteil 4,62 % an allen Neoplasien und 9,12 % an allen Neoplasien von Rüden. Die Anzahl der Fälle in unserem Untersuchungsgut stimmt somit weitgehend überein mit Angaben anderer Untersucher (Bastianello 1983; Kusch 1985; Reifinger 1988). Allerdings konnte ein Vorkommen von 15 % (Prange et al. 1986) in unseren Untersuchungsgut nicht bestätigt werden. Am häufigsten wurden Leydigzelltumore und Seminome beobachtet, weniger häufig Sertolizelltumore, selten Kombinationstumore oder andere Neoplasien. Über die Prävalenz der hauptsächlich vorkommenden parenchymatösen

Hodentumoren des Hundes – das Seminom, der Sertolizelltumor und Leydigzelltumor – gibt es unterschiedliche Angaben: Während Hayes und Pendergrass (1976) von etwa gleichen Häufigkeiten ausgehen, sehen andere Untersucher hauptsächlich Seminome und Sertolizelltumore (Nieto, Pizarro, and Fontaine 1989; Prange et al. 1986; Priester and McKay 1980; Reifinger 1988). Bastianello (1983) konnte in ihrem Untersuchungsgut vornehmlich Sertolizelltumoren ausmachen, wogegen bei uns Leydigzelltumore die Hauptdiagnosen waren. Kombinationstumore waren bei uns ähnlich selten wie bei Reifinger (1988) zu finden.

Prostatatumoren – vornehmlich Adenokarzinome – waren in unserem Sektionsgut extrem selten: Ihr Anteil am Sektionsgut betrug 0,56 %, entsprechend 2,16 % an allen Tumoren, 1,05 % an allen seziierten Rüden, resp. 4,26 % an allen männlichen Tumorträgern. Diese Häufigkeit liegt über den 0,24 % bei Bastianello (1983), den 0,18 % von Eskens (Eskens 1983), den 0,44 % von Kusch (1985), den 0,34 % bei von Sandersleben et al. (1973) oder den 0,31 % bei Stünzi und Lott-Stolz (1965).

Penisneoplasien waren ebenso selten (n=19): 0,17% der seziierten Hunde, 0,31 % der seziierten Rüden, 0,64 % der beobachteten Neoplasien und 1,26 % der Rüden mit Neoplasien). Im Berliner Untersuchungsgut kamen hauptsächlich Plattenepithelkarzinome (n=9) vor. Übertragbare venerische Tumore (auch Sticker-Sarkome genannt) waren lediglich 3 vorhanden. Sticker-Sarkome sind typische Beispiele für geographische Clusterbildung, da sie in bestimmten Gegenden enzootisch vorkommen und dort einen Hauptteil aller caniner Neoplasien stellen können (Bastianello 1983; Batamuzi, Kassuku, and Agger 1992; Ndiritu 1979; Phangcho, Dutta, and Mukit 1990; Rostami et al. 1994).

Tabelle 4.1-34
Rassenrisiko für Hodentumore im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Terrier, Fox-Boxer	5	3,65	1,2	1,972	4,544	10,468
Teckel	13	9,49	5,4	1,481	2,588	4,523
Basset	6	4,38	13,6	0,914	0,413	0,187
Mix	4	2,92	14,8	0,616	0,246	0,098
DSH	27	19,71	28,3	Chi-Quadrat < 3,841		
Pudel	22	16,06	21,3	Chi-Quadrat < 3,841		
Cocker Spaniel	17	12,41	11	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	11	8,03	7,7	Chi-Quadrat < 3,841		
Summe	32	23,36				
	137	100				

Statistisch gesehen sind im Berliner Sektionsgut Foxterrier und Boxer mit einem hohen Risiko für Hodentumore behaftet, während Teckel und Basset deutlich geringere Risiken aufweisen (Tabelle 4.1-34). Eine Disposition der Boxer wird in der Literatur allgemein angenommen (Cohen et al. 1974; Kusch 1985; Reifinger 1988); allerdings meint Reifinger (1988), daß Foxterrier ein deutlich geringeres Risiko ausweisen.

Hodentumorträger waren im Durchschnitt $11,304 \pm 2,831$ Jahre alt; bei 4 kastrierten Rüden wurden Seminometastasen festgestellt (Tabelle 4.1-35). Das im Vergleich zu Literaturangaben hohe Durchschnittsalter steht im Zusammenhang mit dem bei uns zu beobachteten hohen Anteil von Leydigzelltumoren, die vornehmlich bei alten Hunden auftreten (Lipowitz et al. 1973; Nieto, Pizarro,

Tabelle 4.1-35

Alters- und Geschlechtsverteilung von Hodentumoren im Sektionsgut

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	0	0	m	133	97,08
2	4	1	0,78	mk	4	2,92
4	6	1	0,78	Summe	137	
6	8	9	7,03			
8	10	12	9,38			
10	12	28	21,88			
12	14	44	34,38			
14	16	29	22,66			
16	18	4	3,13			
Summe		128	100			

Die 4 kastrierten Rüden hatten Seminom-Metastasen

and Fontaine 1989; Reifinger 1988).

Weibliche Geschlechtsorgane

Insgesamt 98 Hündinnen – das entspricht: 0,86 % aller sezierten Hunde, 3,3 % Anteil an allen Neoplasien, 1,96 % aller sezierter Hündinnen und 6,79 % aller Hündinnen mit Krebs – hatten insgesamt 105 Neoplasien des weiblichen Geschlechtsapparates (Tabelle 4.1-36). Dabei waren mehr **Ovarialtumore** und Karzinome des ovariellen Oberflächenepithels (0,38 % im Sektionsgut, 1,45 % aller Tumore, 0,86 % aller sezierten Hündinnen und 2,98 % aller Hündinnen mit Neoplasien) als **Uterus-** (0,31 % im Sektionsgut, 1,18 % aller Tumore, 0,7 % aller sezierten Hündinnen und 2,43 % aller Hündinnen mit Neoplasien) und **Vaginalneoplasien** (0,24 % im Sektionsgut, 0,91 % aller Tumore, 0,54 % aller

sezierten Hündinnen und 1,87 % aller Hündinnen mit Neoplasien) zu beobachten. Im Gegensatz zum Ovar dominierten in Uterus und Vagina die mesenchymalen Neoplasien.

Im Berliner Sektionsgut sind damit Neoplasien des weiblichen Genitals ungefähr doppelt so häufig wie in anderen Untersuchungen (Bastianello 1983; Kusch 1985; von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973; Weiße 1967).

Die Tatsache, daß **epitheliale Ovartumoren** häufiger beobachtet wurden als gonadale oder mesenchymale Tumoren, steht in Einklang mit Literaturmitteilungen (Hayes and Young 1978; Patnaik and Greenlee 1987). Bastianello (1983) allerdings sieht in ihrem Material eindeutig Granulosazelltumore als häufigste Entität.

In verschiedenen Veröffentlichungen wird betont, daß **uterine Neoplasien** sehr selten sind (Brodey and Roszel 1967; Elsinghorst, Timmermans, and Hendriks

Tabelle 4.1-36

Neoplasien des weiblichen Geschlechtsapparates bei 98 Tumorträgerinnen (Mehrfachnennungen)

	n	%	% aller Obduktionen
Ovar	43	100	0,38
Adenokarzinom	24	55,81	0,21
Granulosazelltumor	9	20,93	0,08
Hämangiosarkom	5	11,63	0,04
Dysgerminom	2	4,65	0,02
Thekom	1	2,33	0,01
Fibrosarkom	1	2,33	0,01
Blastom	1	2,33	0,01
Uterus	35	100	0,31
Leiomyosarkom	12	34,29	0,11
Adenokarzinom	10	28,57	0,09
Fibrosarkom	5	14,29	0,04
Hämangiosarkom	5	14,29	0,04
Blastom	2	5,71	0,02
Chorioepitheliom	1	2,86	0,01
Vagina	27	100	0,24
Leiomyom	15	55,56	0,13
Fibrosarkom	3	11,11	0,03
Plattenepithelkarzinom	3	11,11	0,03
Papillom	2	7,41	0,02
Malignes Lymphom	2	7,41	0,02
Hämangiosarkom	1	3,7	0,01
Melanom	1	3,7	0,01

1984; Kusch 1985; Vos 1988); ebenso wie im Berliner Material sehen Brodey and Roszel (Brodey and Roszel 1967) mehr mesenchymale Neoplasien als epitheliale im Uterus.

Dies gilt prinzipiell auch für vaginale Neoplasien, bei denen eine Häufung mesenchymaler Tumoren vorzuliegen scheint (Bastianello 1983; Brodey and Roszel 1967; Kydd and Burnie 1986; Thacher and Bradley 1983). Allerdings wurden im Berliner Sektionsgut auch keine Sticker-Sarkome bei Hündinnen gefunden.

Kuvasz, Airedale-Terrier, Berner Sennenhund, Cocker Spaniel und Pudel schie-
nen deutlich höhere Risiken für die Ausbildung von Neoplasien aufzuweisen

Tabelle 4.1-37

Rassenrisiko für Neoplasien des weiblichen Geschlechtsapparates im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Kuvasz	2	1,82	0,2	4,106	12,867	40,32
Terrier, Airedale-Sennenhund, Berner	3	2,73	0,5	2,178	6,115	17,171
Cocker Spaniel	2	1,82	0,4	1,525	5,457	19,533
Pudel	16	14,55	5,9	1,831	3,055	5,096
Mix	19	17,27	8,4	1,581	2,564	4,159
DSH	17	15,45	21,7	Chi-Quadrat < 3,841		
Boxer	14	12,73	16,3	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	7	6,36	4,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	7	6,36	10,4			
Summe	23	20,91				
Summe	110	100				

Tabelle 4.1-38

Alters- und Geschlechtsverteilung bei Neoplasien des weiblichen Geschlechtsapparate

Altersgruppen in J.		n	%
Von ()	bis (<)		
0	2	1	1,05
2	4	1	1,05
4	6	1	1,05
6	8	3	3,16
8	10	15	15,79
10	12	25	26,32
12	14	34	35,79
14	16	10	10,53
16	18	5	5,26
Summe		95	100

Geschlecht	n	%
w	95	91,35
wk	9	8,65
Summe	104	100

(Tabelle 4.1-37). In der Literatur werden außer von Hayes and Young (1978), die eine Disposition für Pointerrassen und Englischen Bulldog feststellen, nur noch von Brodey and Roszel (1967), die den Boxer für disponiert halten, Vermutungen über Rassenrisiken geäußert.

Das Durchschnittsalter der Hündinnen mit Neoplasien des weiblichen Geschlechtsapparates betrug $11,332 \pm 2,669$ Jahre, wobei in der Altersgruppe zwischen 10. und 12. Lebensjahr die meisten Tumorträgerinnen zu finden waren (Tabelle 4.1-38). Damit liegt der Altersdurchschnitt der betroffenen Hündinnen über dem Durchschnitt aller Tumorträger und ist auch höher als in vergleichbaren Untersuchungen (Brodey and Roszel 1967; Kusch 1985; Patnaik and Greenlee 1987).

91,35 % der Tumorträgerinnen waren intakte Hündinnen, 8,65 % kastriert (Tabelle 4.1-38). Da von den 27 Hündinnen mit vaginalen Neubildungen nur 4 kastriert waren, könnte das ein Hinweis darauf sein, daß Tumoren des Geschlechtsapparates hormonabhängig sind und daher bei kastrierten Tieren seltener auftreten (Bender, Dorn, and Schneider 1984; Thacher and Bradley 1983).

Tumore des Endokrinums

Im Endokrinum wurden insgesamt 343 Neoplasien (ohne gonadale Neubildungen) bei 337 Tumorträgern festgestellt (Tabelle 4.1-39). Das bedeutet, daß 2,96 % aller sezierten Hunde und 11,36 % aller Tumorträger betroffen waren. Das ist erheblich mehr als die 1,95 % Tumorträger bei Bastianello (1983).

Hypophysäre epitheliale Herdbildungen, die expansiv wachsend zu Druckatrophie führten und Kapselbildungen erkennen lassen, wurden als Adenome bezeichnet; invasives Wachstum entlang des Hypophysenstiels in Gehirn und 3. Ventrikel wurde als Malignitätskriterium aufgefasst und entsprechend als Adenokarzinom bezeichnet. Die meisten hypophysären Neubildungen fanden sich – wie erwartet (Capen, Martin, and Koestner 1967; Etreby et al. 1980; Halmi et al. 1981; Nothelfer 1993) – in der Pars distalis und seltener in der Pars intermedialis. Von 78 Neoplasien hypophysären Ursprungs waren 72 Adenome und 6 Adenokarzinome. Damit hatten 0,68 % aller sezierten Hunde (2,63 % aller Tumorträger) primäre (Leifer, Peterson, and Matus 1986) Hypophysentumoren. Das sind deutlich mehr als die 0,31 % bei Brodey (1970b), oder die 0,11 % bei von Sandersleben, Schäffer und Weisse (1973), aber erheblich geringer als die 19 % bei Willeberg und Priester (1982).

Von den 60 Adenokarzinome der **Schilddrüse** (relativer Anteil am Sektionsgut: 0,53 %), meist mit papillärem oder solidem Wachstum, zeigten 20 Infiltration in die Umgebung, Gefäßeinbruch und Metastasierung in die Lunge. Während in

den 50er Jahren Schilddrüsentumore des Hundes zu den häufigsten Neoplasiearten zählte (Dobberstein 1953), ist offensichtlich auch durch Jodsubstitution in den Futtermitteln, die Inzidenz von Schilddrüsentumoren stark rückläufig (Eskens 1983; Kusch 1985; Scarlett 1994).

Die 21 Inselzelltumoren (Anteil am Sektionsgut = 0,18 %) wiesen in allen Fällen insulinhaltige Zellen auf, 8 Fälle zusätzlich Somatostatin, 2 Fälle Pankreatisches Polypeptid und 1 Fall zusätzlich Glukagon. Ähnliches ist aus der Literatur bekannt (Bestetti and Rossi 1985; Moore, Dayal, and Shelton 1985; O'Brien et al. 1987; Otto 1992). Tumoren des Inselapparates gehören zu den seltenen Neoplasien beim Hund (Pospischil and Gerbig 1982; Priester 1974). Sie sind in

Tabelle 4.1-39
Neoplasien des Endokrinums (ohne Gonaden) bei 337 Tumorträger

	n	%	% aller Obduktionen
Hypophyse	83	100	0,73
Adenom	72	86,75	0,63
Adenokarzinom	6	7,23	0,05
Meningeom	2	2,41	0,03
Hämangiosarkom	1	1,20	0,01
Malignes Lymphom	1	1,20	0,01
Metastase in Hypophyse	1	1,20	0,01
Adenokarzinom Mamma	1	1,20	0,01
Schilddrüse	62	100	0,54
Adenokarzinom	60	96,77	0,53
davon 20 mit Metastasen in Lunge; je 2 in Trachea, Öso- phagus und Herz			
Hämangiosarkom	2	3,23	0,02
Endokriner Pankreas	21	100	0,18
Inselzelltumor	21	100	0,18
Nebenniere	178	100	1,56
Adenom der Rinde	88	49,44	0,77
Adenokarzinom der Rinde	36	20,22	0,32
davon 30 mit Metastase in Leber			
Paragangliom	25	14,04	0,22
Metastasen in Nebenniere	29	16,29	0,25
Karzinom-Metastasen	15	8,43	0,13
Malignes Lymphom	3	1,69	0,03
Melanom	2	1,12	0,02
Hämangiosarkom	5	2,81	0,04
Mastzellentumor	2	1,12	0,02
Sarkom-Metastase	2	1,12	0,02

nahezu allen Fällen Insulin-positiv, seltener wird zusätzlich Somatostatin, Pancreatisches Polypeptid und/oder Glukagon exprimiert. Diese Tendenz bestätigt die Ergebnisse anderer Untersucher (Bestetti and Rossi 1985; Hawkins et al. 1987; O'Brien et al. 1987; Otto 1992).

In der **Nebennierenrinde** wurden zumeist Adenome (n=88) und seltener Adenokarzinome (n=36) beobachtet, die meist von der Zona fasciculata oder reticularis ausgingen. Die meisten Adenokarzinome (n=30) waren ins Gefäßsystem eingebrochen und bildeten Metastasen in der Leber. Die insgesamt 124 Nebennierenrindentumoren hatten ein Anteil von 1,09 % am Sektionsgut und bildeten 4,18 % aller festgestellter Neoplasien. Damit liegen im Berliner Sektionsgut Tumoren der Nebennierenrinde im Bereich der von Willeberg und Priester (1982) mitgeteilten (klinischen) Häufigkeiten, aber erheblich höher als beispielsweise bei Bastianello (1983).

Neben 25 Paragangliomen (Phäochromozytome) des **Nebennierenmarks** wurden in 29 Fällen (16,29 %) Metastasen in die Nebennieren beobachtet. Nebennierenmarkstumoren hatten somit einen Anteil von 0,22 % am Sektionsgutes und von

Tabelle 4.1-40
Rassenrisiko für primäre Neoplasien des Endokrinums im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Pudel, Groß-	2	0,65	0,2	4,148	14,379	49,84
Eurasier	2	0,65	0,3	2,495	8,985	32,359
Schnauzer, Mittel-	6	1,94	1,3	2,334	5,065	10,99
Terrier, Fox-	10	3,23	2,7	2,258	4,163	7,674
Pudel, Zwerg-	7	2,26	2,7	1,325	2,789	5,872
Boxer	30	9,68	12,3	1,866	2,712	3,941
Pudel, insgesamt	56	18,1	24,9	1,971	2,626	3,499
Schnauzer, insgesamt	16	5,16	7,4	1,396	2,31	3,823
DSH	22	7,1	48,2	0,267	0,407	0,621
Terrier, Yorkshire-	5	1,61	16,2	0,126	0,291	0,671
Rottweiler	2	0,65	8,9	0,061	0,215	0,763
Mix	58	18,7	64	Chi-Quadrat < 3,841		
Terrier, insgesamt	31	10	33,5	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	28	9,03	30,7	Chi-Quadrat < 3,841		
Cocker Spaniel	21	6,77	17,5	Chi-Quadrat < 3,841		
Beagle	5	1,61	3,8	Chi-Quadrat < 3,841		
Collie	5	1,61	3,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Pudel, Klein-	5	1,61	2,6	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	102	32,9				
Summe*	310	100				

* Korrigierte Zahlen: Nur Primärtumore; Mehrfachnennungen deletiert.

0,84 % bei den Tumorträgern; auch das ist erheblich höher als die 0,24 % Anteil an den Tumorträgern bei Bastianello (1983).

Hohe Risiken für endokrine Neoplasien zeigten vor allem Pudel- und Schnauzerschläge, sowie Boxer und Eurasier. Deutscher Schäferhund, Yorkshire-Terrier und Rottweiler schienen nicht gefährdet zu sein (Tabelle 4.1-40). In der Literatur scheint dabei Übereinstimmung für eine Disposition von Pudel und Boxer zu bestehen (Capen, Martin, and Koestner 1967; Hayes and Fraumeni 1975; Nothelfer and Weinhold 1992; Stünzi and Lott-Stolz 1965). Willeberg und Priester (1982) sehen ein Risiko bei Boxern für Hypophysentumoren und bei Teckeln für Nebennierenrindentumoren.

Tabelle 4.1-41

Alters- und Geschlechtsverteilung bei Neoplasien des Endokrinums im Sektionsgut

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	1	0,326	m	130	42,07
2	4	3	0,977	mk	15	4,85
4	6	5	1,629	w	146	47,25
6	8	11	3,583	wk	18	5,83
8	10	54	17,59	Summe	309	100
10	12	84	27,362			
12	14	84	27,362			
14	16	57	18,567			
16	18	8	2,606			
Summe		307	100			

Bei einem relativ hohen Durchschnittsalter von $11,2 \pm 2,617$ Jahren waren zwischen 10. und 12. Lebensjahr die meisten Tiere betroffen (Tabelle 4.1-40).

Weibliche Tiere schienen leicht bevorzugt betroffen zu sein (Tabelle 4.1-41); ein Tatbestand auf den auch andere Untersucher (Kusch 1985; Willeberg and Priester 1982) aufmerksam machen.

Neoplasien des Binde- und Stütz - gewebes

Im Knochen standen Osteosarkome im Vordergrund (Tabelle 4.1-42). Bei diesen Tumoren ist zwischen zentralem, peripheren und Gelenksvarianten zu unterscheiden (Slayter et al. 1994). Weitere Unterschiede sind eine produktive Variante mit Ausbildung von Osteoid und eine nonproduktive Form. Ebenso be-

deutsam ist die Anwesenheit von Riesenzellen; der früher geläufige Ausdruck „osteoklastisches Sarkom“ wurde fallen gelassen wurde, da sowohl Osteoklasten als auch fusionierte Tumorriesenzellen das Bild prägen (Jösten 1995). Nur bei 2 % aller seziierten Hunde (7,68 % aller Tumorträger) wurden in unserem Sektionsgut Neoplasien im Knochen (n=228) gefunden. Betrachtet man ausschließlich die Osteosarkome (n=94) so nehmen diese einen Anteil von 0,83 % an allen seziierten Hunden (3,17 % an Tumorträgern) ein; ähnliche Anteile werden auch von anderen Untersuchern mitgeteilt (Eskens 1983). Deutliche höhere Anteile (2,6 %) werden von Schulz (1958) berichtet, während Kusch (1985) nur 0,7 % feststellen konnten. Metastasen, vornehmlich Karzinommetastasen, machen immerhin 24,12 % aller Knochentumoren aus; ein in der Veterinärmedizin oft vernachlässigtes, aber beschriebenes Phänomen (Durham and Dietze 1986; Goedegebuure 1979; Russel and Walker 1983; von Dewitz 1987).

Außer Karzinommetastasen (n=10) waren mit jeweils n=9 Plasmazellentumore

Tabelle 4.1-42

Tumore des Binde- und Stützgewebes bei 305 Tumorträgern

	n	%	% aller Obduktionen
Knochen	228	100	2
Osteosarkom	94	41,23	0,83
Karzinom-Metastasen	55	24,12	0,48
Fibrosarkom	35	15,35	0,31
Chondrosarkom	17	7,46	0,15
Komplexes Sarkom	12	5,26	0,11
Synoviasarkom	5	2,19	0,04
Melanom	5	2,19	0,04
Plasmozytom	3	1,32	0,03
Malignes Lymphom	2	0,88	0,02
Wirbelsäule	47	100	0,41
Karzinom-Metastasen	10	21,28	0,09
Plasmozytom	9	19,15	0,08
Hämangiosarkom	9	19,15	0,08
Osteosarkom	7	14,89	0,06
Chondrosarkom	5	10,64	0,04
Fibrosarkom	4	8,51	0,04
Malignes Lymphom	2	4,26	0,02
Liposarkom	1	2,13	0,01
Muskulatur	51	100	0,45
Karzinommetastase	21	41,18	0,18
Fibrosarkom	15	29,41	0,13
Hämangiosarkom	9	17,65	0,08
Malignes Lymphom	5	9,8	0,04
Rhabdomyosarkom	1	1,96	0,01

zusammen mit Hämangiosarkomen im Berliner

Sektionsgut die häufigsten Tumoren der **Wirbelsäule**. Das Vorkommen von Plasmazellentumore in Knochen und Wirbelsäule wird als relativ seltenes Ereignis beschrieben (Breuer et al. 1993; Matus and Leifer 1985; Osborne et al. 1968).

Neben Karzinommetastasen – meist regionär infiltrierend – kamen in der **Muskulatur** außer Fibrosarkomen (n=15) nur noch Hämangiosarkome (n=9) und Maligne

Lymphome (n=5) vor; autochtone Tumoren (n=1) – Rhabdomyosarkome – wurden nicht nur in Berlin extrem selten beobachtet (Kim et al. 1996; Krotje, Ware, and Niyo 1990; Madewell et al. 1988; Mulas et al. 1994; Rivera and Carlton 1992; Sarnelli, Grassi, and Romagnoli 1994; Vechten et al. 1990; Weinstein, Carpenter, and Schunk 1989).

Barsoi, Berner Sennenhund, Rottweiler, Dobermann und Bobtail schienen deut-

Tabelle 4.1-43
Rassenrisiken für Neoplasien des Binde- und Stützapparates im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Barsoi	4	1,18	0,7	2,72	6,91	17,557
Sennenhund, Berner	5	1,47	1,3	1,881	4,441	10,483
Rottweiler	26	7,65	9,8	1,988	2,956	4,396
Dobermann	9	2,65	3,5	1,423	2,754	5,331
Bobtail	6	1,76	2,7	1,055	2,373	5,336
Mix	48	14,12	70,2	0,459	0,624	0,848
Teckel	20	5,88	33,7	0,357	0,56	0,878
Pudel	14	4,12	27,3	0,285	0,484	0,821
Terrier	11	3,24	36,8	0,153	0,269	0,473
DSH	52	15,29	52,9	Chi-Quadrat < 3,841		
Cocker Spaniel	24	7,06	19,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Boxer	17	5	13,5	Chi-Quadrat < 3,841		
Schnauzer	10	2,94	8,1	Chi-Quadrat < 3,841		
Collie	7	2,06	3,5	Chi-Quadrat < 3,841		
Setter	7	2,06	3,6	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	80	23,53	-			
Summe	340	100				

Tabelle 4.1-44
Geschlechts- und Altersverteilung (Jahre) der Hunde mit Neoplasien des Stütz- und Bindegewebes

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht	n	%
Von ()	bis (<)					
0	2	7	2,33	m	170	56,48
2	4	6	2	mk	10	3,32
4	6	20	6,67	w	104	34,55
6	8	46	15,33	wk	17	5,65
8	10	70	23,33	Summe	301	100
10	12	76	25,33			
12	14	55	18,33			
14	16	20	6,67			
Summe		300	100			

lich erhöhte Risiken für Tumore des Binde- und Stützgewebes zu tragen, während Pudel, Teckel, Mischlingshunde und Terrierschläge nicht anfällig waren (Tabelle 4.1-43). Das entspricht der allgemein angenommenen Disposition der großen Hunderrasse für ossäre Neoplasien (Jongeward 1985; Knecht and Priester 1978; Kuntscher 1979; Misdorp and Hart 1979; Tjalma 1966).

Das Durchschnittsalter der Tumorträger betrug $9,234 \pm 3,063$ Jahre, wobei in den Altersgruppen zwischen 8 und 12 Jahren nahezu 50 % der Hunde zu finden waren. Rüden waren deutlich häufiger betroffen als Hündinnen (Tabelle 4.1-44); dieser Fakt wird auch in der Literatur betont (Misdorp and Hart 1979).

Verdauungstrakt

Mit 290 autochthonen Neoplasien (ohne Neoplasien der Tonsillen, die bei den lymphohämatopoetischen Organen aufgeführt werden) war der Verdauungstrakt die vierthäufigste Organlokalisation im Berliner Sektionsgut (Tabelle 4.1-45). Bei der Auswertung haben wir uns der Auffassung Hoyts und Withrows (1984) angeschlossen, die Plattenepithelkarzinome der Tonsillen als eigenständige Entitäten anzusehen, und in Konsequenz dem lymphohämatopoetischen System zugeordnet. Epuliden, die bei Biopsien eine große Rolle spielen, waren im Sektionsgut nicht vertreten.

In der **Maulhöhle** waren an primären Tumoren vornehmlich Melanome, mesenchymale Neoplasien und Plattenepithelkarzinome anzutreffen, die bei immerhin 3 % aller Tumorträger (n=89) auftraten. Diese Häufigkeit und die aufgetretenen Tumortypen entsprechen Literaturangaben (Brodey 1970a; Dorn and Priester 1976; Hoyt and Withrow 1984; Martin 1977; Todoroff and Brodey 1979; Vos and van der Gaag 1987).

Die **Zunge** war in nur insgesamt 7 Fällen betroffen (3 Plattenepithelkarzinome, 2 Fibrosarkome, 1 Malignes Lymphom und 1 Melanom). Bei Auswertung von 57 Fällen von Zungentumoren sehen Beck et al. (1986) 47,37 % Plattenepithelkarzinome, 12,28 % Melanome und 8,77 % Mastzellentumore. Granularzelltumore (Beck et al. 1986; Geyer et al. 1992; Van der Gaag, Walvoort, and Van der Gaag 1983) konnten in Berlin nicht gesehen werden.

Noch seltener fanden sich primäre Neoplasien des **Ösophagus** (n=4), häufiger waren sogar regionäre Metastasen (n=5) in den Ösophagus zu finden. Als häufigste primäre Tumortypen des Ösophagus werden Sarkome, inklusive Fibrosarkome und Osteosarkome, beschrieben (Hayden and Nielsen 1973; Wilson, Holscher, and Laney 1991), wobei seltener Karzinome (Carb and Goodman 1973; McCaw, Pratt, and Walshaw 1980), gelegentlich jedoch Karzinometastasen (Ridgway and Suter 1979), beobachtet werden. Fibrosarkome, die metaplastisch

in osteogene Sarkome transformiert werden, sind häufig Folge einer Infektion mit *Spirocerca lupi*, so daß in Gegenden, in denen dieser Helminth enzootisch vorkommt, auch entsprechende Neoplasien der Speiseröhre häufiger beobachtet werden (Bailey 1979; Ivoghli 1978).

Tabelle 4.1-45

Neoplasien des Verdauungstrakt bei 308 Tumorträgern im Sektionsgut

	n	%	% aller Obduktionen
Maulhöhle	92	100	0,81
Melanom	40	43,48	0,35
Fibrosarkom	15	16,3	0,13
Plattenepithelkarzinom	14	15,22	0,12
Malignes Lymphom	8	8,7	0,07
Komplexes Sarkom	5	5,43	0,04
Mastzellentumor	4	4,35	0,04
Osteosarkom	3	3,26	0,03
Adenokarzinom	2	2,17	0,02
Ameloblastom	1	1,09	0,01
Zunge	7	100	0,06
Plattenepithelkarzinom	3	42,86	0,03
Fibrosarkom	2	28,57	0,02
Malignes Lymphom	1	14,29	0,01
Melanom	1	14,29	0,01
Ösophagus	9	100	0,08
Fibrosarkom	2	22,22	0,02
Leiomyofibrom	2	22,22	0,02
Schilddrüsenkarzinom	2	22,22	0,02
Plattenepithelkarzinom	1	11,11	0,01
Bronchialkarzinom	1	11,11	0,01
Adenokarzinom	1	11,11	0,01
Magen	79	100	0,69
Adenokarzinom	45	56,96	0,4
Leiomyosarkom	16	20,25	0,14
Malignes Lymphom	18	22,78	0,16
Darm ohne Lokalisationsangaben	13	100	0,11
Malignes Lymphom	11	84,62	0,1
Adenokarzinom	2	15,38	0,02
Dünndarm	63	100	0,55
Malignes Lymphom	27	42,86	0,24
Adenokarzinom	26	41,27	0,23
Hämangiosarkom	7	11,11	0,06
Leiomyosarkom	2	3,17	0,02
Maligne Histiozytose	1	1,59	0,01
Dickdarm	35	100	0,31
Adenokarzinom	17	48,57	0,15
Hämangiosarkom	9	25,71	0,08
Malignes Lymphom	8	22,86	0,07
Maligne Histiozytose	1	2,86	0,01

Mit 79 Fällen war der **Magen** das am zweithäufigsten betroffene Kompartiment des Verdauungstraktes: Es dominierten Adenokarzinome (n=45) vor Malignen Lymphomen (n=18) und Leiomyosarkomen (n=16). Damit traten bei 0,69 % der seziierten Hunde (2,66 % der Tumorträger) Magentumore auf. Das sind doppelt so viele Fälle wie bei Landes und von Sandersleben (1985) ähnelt aber den 0,54 % bei Patnaik, Hurvitz und Johnson (1977). Neben Adenokarzinomen (Fonda, Gualtieri, and Scanziani 1989; Kolbjornsen, Press, and Landsverk 1994; Landes and von Sandersleben 1985; Scanziani et al. 1991) und Tumoren der glatten Muskulatur (Culbertson, Branam, and Rosenblatt 1983; Kapatkin et al. 1992; Krauser 1985; Pfeil and Loupal 1984), werden Maligne Lymphome (Brunnert et al. 1992; Couto et al. 1989; Steinberg et al. 1995;

Tabelle 4.1-46

Rassenrisiko für Neoplasien des Verdauungstraktes im Sektionsgut (ohne Tonsillen)

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Pudel	41	13,1	25,1	1,265	1,761	2,452
Boxer	20	6,39	12,4	1,066	1,686	2,666
Cocker Spaniel	27	8,63	17,7	1,075	1,603	2,39
DSH	33	10,54	48,7	0,909	0,633	0,441
Terrier	14	4,47	33,8	0,637	0,379	0,225
Mix	77	24,6	64,6	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	35	11,18	31	Chi-Quadrat < 3,841		
Schnauzer	12	3,83	7,4	Chi-Quadrat < 3,841		
Rottweiler	8	2,56	9			
Übrige Rassen	46	14,7				
Summe	313					

Tabelle 4.1-47

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit Neoplasien des Verdauungstraktes im Sektionsgut (ohne Tonsillen)

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	7	2,29	m	180	57,88
2	4	10	3,27	mk	8	2,57
4	6	12	3,92	w	111	35,69
6	8	41	13,40	wk	12	3,86
8	10	49	16,01	Summe	311	100
10	12	72	23,53			
12	14	71	23,20			
14	16	39	12,75			
16	18	5	1,63			
Summe		306	100			

Weaver 1976) beobachtet.

Im **Dünndarm** fanden sich 63 primäre Neoplasien: 27 Maligne Lymphome und 26 Adenokarzinome. Beide Tumortypen gelten als häufige Dünndarntumoren des Hundes (Couto et al. 1989; Gibbs and Pearson 1986; Head and Else 1981; Van der Gaag, Happe, and Van der Gaag 1989b; Van der Gaag, Happe, and Van der Gaag 1990; Weaver 1976).

Der **Dickdarm** wies in unserem Untersuchungsgut weniger Neoplasien auf als der Dünndarm: zumeist Adenokarzinome (n=17), daneben aber auch Hämangio-sarkome (n=9), Maligne Lymphome (n=8) und einen Fall einer Malignen

Histiozytose auf.

Auch in der Literatur werden deutlich mehr Adenokarzinome als Maligne Lymphome beschrieben (Landes and von Sandersleben 1985; Patnaik, Hurvitz, and Johnson 1977; Pfeil and Loupal 1984; Van der Gaag, Happe, and Van der Gaag 1989a). Neoplasien der gatten Muskulatur des Dickdarms werden insgesamt sehr selten beobachtet (Kapatkin et al. 1992; Mcpherron 1992).

Insgesamt waren in Magen und Dünndarm weitaus mehr Neoplasien nachzuweisen als im Dickdarm (Tabelle 4.1-45); einschränkend ist zu bemerken, daß in 15 Fällen die genaue Darmzuordnung auch histologisch nicht mehr abklärbar war. Während zum Teil der Dickdarm als Prädelektionstelle gesehen wird (Magunna and Mehring 1966; Patnaik, Hurvitz, and Johnson 1977; Pfeil and Loupal 1984), berichten andere Untersucher über eine Bevorzugung des Dünndarms (Estrada et al. 1983; Hayden and Nielsen 1973; Pfeil and Loupal 1984) oder ein gleichhäufiges Vorkommen von Neoplasien (Birchard, Couto, and Johnson 1986). Das numerische Übergewicht von Adenokarzinomen im gesamten Magen-Darmtrakt wird auch in der Literatur beschrieben (Hayden and Nielsen 1973; Pfeil and Loupal 1984); über ein häufigeres Auftreten von Malignen Lymphomen wird jedoch seltener berichtet (Gibbs and Pearson 1986; Head and Else 1981).

Pudel, Boxer und Cocker Spaniel waren in unserem Untersuchungsgut disponiert für Neoplasien des Verdauungstraktes (Tabelle 4.1-46). Eine Disposition der Pudel vermutet auch Kusch (1985) in ihrem Material. Collie und Schäferhund scheinen nach anderen Angaben (Patnaik, Hurvitz, and Johnson 1977) vermehrt an Neoplasien des Magen und Darmes zu erkranken.

Das Durchschnittsalter der betroffenen Hunde betrug $9,977 \pm 3,422$ Jahre, wobei nahezu 50 % der Fälle in der Altersgruppe zwischen 10 und 14 Jahren zu finden waren (Tabelle 4.1-47). Rüden waren deutlich häufiger betroffen als Hündinnen (Tabelle 4.1-47), was auch andere Untersucher feststellten (Hayden and Nielsen 1973; Patnaik, Hurvitz, and Johnson 1977; Pfeil and Loupal 1984).

²Einschränkend ist zu bemerken, daß nicht alle Gehirntumore unseres Sektionsgutes in dieser Untersuchung auftauchen: Gehirne epileptischer Hund aus der Klinik und Poliklinik für Kleine Haustiere der FU Berlin wurden im Rahmen eines Epilepsieforschungsprogrammes an das Institut für Tierpathologie (Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie) der Ludwig-Maximilians-Universität München gesandt. Wieviele Gehirntumoren darunter waren, war nicht zu recherchieren.

ZNS-Tumore

1,33 % aller seziierten Tiere (n=152) hatten Gehirntumore² (Tabelle 4.1-48). Allerdings waren davon 46,7 % (n=71) Metastasen. Neben Neoplasien ausgehend von der Neuroglia (*Astrozytom*, *Oligodendrogliom*, *Gliome*, *Glioblastom*), wurden Tumore des Ependyms und der Plexus chorioideus gefunden; am häufigsten konnten Tumoren der Leptomeninx, *Meningeome*, gefunden werden.

In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben zum Vorkommen der typischen Gehirntumorarten: Während einige Untersucher (Hayes, Priester Jr, and Pendergrass 1975; Luginbühl, Fankhauser, and McGrath 1968; Vandavelde, Fankhauser, and Luginbühl 1985) hauptsächlich neurogliale Tumore sehen, werden in anderen Untersuchungen Meningeome (Bastianello 1983; Foster, Carrillo, and Patnaik 1988; Ribas et al. 1991) als häufigste Tumoren angesehen.

Ependymome scheinen insgesamt eine eher seltenere Entität zu sein (Baumgärtner and Peixoto 1987; Luginbühl, Fankhauser, and McGrath 1968; Vandavelde, Fankhauser, and

Luginbühl 1985). Nur sporadisch wird in der Literatur von primären ZNS-Lymphomen berichtet (Couto et al. 1984; Vandavelde, Fatzner, and Fankhauser 1981). Gehirnmetastasen werden in der Literatur seltener als in unserem Untersuchungsgut gesehen (Fenner 1990; Luginbühl 1963; Moore et al. 1996).

Französische Bulldogge und Boxer waren die einzigen Rassen für die statistisch im Berliner Untersuchungsgut ein Risiko vorlag (Tabelle 4.1-49); die meisten Gehirntumore (n = 22) waren bei Boxern zu finden. In verschiedenen Mitteilun-

Tabelle 4.1-48
ZNS-Tumore bei 162 Tumorträgern

	n	%	% aller Obduktionen
Gehirn-Tumore	81	100	0,71
Ependymom	10	12,35	0,09
Plexus-Papillom	3	3,70	0,03
Astrozytom	6	7,41	0,05
Oligodendrogliom	7	8,64	0,06
Glioblastom	14	17,28	0,12
Gliom	9	11,11	0,08
Meningeom	32	39,51	0,28
Metastasen ins Gehirn	71	100	0,62
Karzinom (davon 18 aus Mamma)	31	43,66	0,27
Hämangiosarkom	25	35,21	0,22
Fibrosarkom	2	2,82	0,02
Osteosarkom	2	2,82	0,02
Melanom	5	7,04	0,04
Malignes Lymphom	6	8,45	0,05
Rückenmark (RM)	9	100	0,08
Meningeom	5	55,56	0,04
Schwannom	2	22,22	0,02
Komplexes Sarkom	2	22,22	0,02
Metastasen ins RM	8	100	0,07
Karzinom	2	25	0,02
Malignes Lymphom	2	25	0,02
Blastom	1	12,50	0,01
Hämangiosarkom	1	12,50	0,01
Plasmozytom	1	12,50	0,01
Melanom	1	12,50	0,01

Tabelle 4.1-49
Rassenrisiko für primäre Tumore des Gehirns im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Bulldogge, Franz.	3	3,7	0,3	4,864	12,386	31,539
Boxer	22	27,16	3,2	6,276	9,454	14,242
Mix	15	18,52	16,7	Chi-Quadrat < 3,841		
DSH	14	17,28	12,6	Chi-Quadrat < 3,841		
Pudel, insgesamt	10	12,35	6,5	Chi-Quadrat < 3,841		
Terrier, Yorkshire-	3	3,7	4,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	14	14,81				
Summe	81	100				

gen gelten brachyozepale Rassen wie Boxer, Bostonterrier oder Englische Bulldogge als disponiert (Fischer 1967; Hayes, Priester Jr, and Pendergrass 1975; Jacob 1959; Luginbühl, Fankhauser, and McGrath 1968; Palmer 1976).

An Gehirntumoren erkrankte Hunde zeigten einen Altersdurchschnitt von $9,405 \pm 2,912$ Jahren, wobei über 50 % der Tiere in der Altersgruppe zwischen 8 und 12 Jahre zu finden war, bei einem leichten Überwiegen von männlichen Tieren (Tabelle 4.1-50). Meningeale Tumoren scheinen eher bei jüngeren Hunden zu entstehen als neurogliale (Foster, Carrillo, and Patnaik 1988; Hayes, Priester Jr, and Pendergrass 1975; Palmer 1976; Patnaik, Kay, and Hurvitz 1986).

Neoplasiearten

In Tabelle 4.1-51 sind die beobachteten Neoplasien nach ihrer Herkunft summarisch aufgeführt.

Demnach sind Karzinome die häufigste Tumorart im Sektionsgut. Mesenchymale Neoplasien (ohne Maligne Lymphome) werden seltener beobachtet. Als

Tabelle 4.1-50

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit primären Gehirntumoren im Sektionsgut

Altersgruppen in J.		n		%	
Von ()	bis (<)				
0	2	1	1,27		
2	4	0	0		
4	6	7	8,86		
6	8	12	15,19		
8	10	19	24,05		
10	12	22	27,85		
12	14	12	15,19		
14	16	4	5,06		
16	18	2	2,53		
Summe		79	100		

Geschlecht	n	%
m	42	53,16
w	36	45,57
wk	1	1,27
Summe	79	100

häufigste Einzeldiagnose wurde 535mal das Hämangiosarkom diagnostiziert. Maligne Lymphome (inklusive 22 Plasmazellentumore) sind die dritthäufigste Entität. Die Dominanz epithelialer Tumoren ist auch in der Literatur allgemein akzeptiert (z.B. MacVean et al. 1978).

Hunde mit Karzinomen wurden im Durchschnitt $10,916 \pm 2,876$ Jahre alt, wobei über 50 % der Tumorträger in der Altersgruppe 10 bis 12 Jahre war (Tabelle 4.1-53). Weibliche Tiere hatten deutlich mehr Karzinome als männliche Tiere (Tabelle 4.1-53).

Deutlich überhöhte Risiken für Sarkome wiesen Barsoi, Boxer, Schäferhund und Afghane auf (Tabelle 4.1-54). Die Sarkomträger wiesen einen Altersdurchschnitt von $9,895 \pm 2,857$ Jahren auf, wobei über 50 % der Tumorträger in der Altersklasse zwischen 8 und 12 Jahre zu finden waren (Tabelle 4.1-55). Rüden

Tabelle 4.1-51

Histomorphologische Herkunft der Tumoren im Sektionsgut bei 2.967 Tumorträgern (Mehrfachnennungen)

	n	%	% aller Obduktionen
Karzinom	1.133	38,19	9,95
Sarkom	783	26,39	6,88
davon: 535 Hämangiosarkome			4,70
Malignes Lymphom	410	13,82	3,60
Neuronale Neoplasien	81	2,73	0,71
Melanom	69	2,33	0,61
Blastom	50	1,69	0,44

Tabelle 4.1-52

Rassenrisiko für Ausbildung von Karzinomen im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Puli	3	0,26	0,6	2,427	9,072	33,909
Deutsch Kurzhaar	8	0,71	3	1,538	3,307	7,109
Cocker Spaniel	113	9,97	64	1,649	2,033	2,506
Setter	21	1,85	12,1	1,191	1,898	3,025
Pudel	140	12,36	90,9	1,429	1,727	2,087
Boxer	58	5,12	44,9	1,021	1,354	1,795
DSH	140	12,36	176,2	0,62	0,745	0,896
Terrier	78	6,88	122,5	0,462	0,584	0,739
Dobermann	5	0,44	11,6	0,168	0,401	0,956
Chihuahua	4	0,35	11,4	0,126	0,324	0,836
Rottweiler	11	0,97	32,5	0,174	0,308	0,546
Pekingese	2	0,18	11,2	0,048	0,162	0,55
Übrige Rassen	550	48,54				
Summe	1133	99,99				

waren von Sarkomen deutlich häufiger betroffen als Hündinnen (Tabelle 4.1-55).

Für das Hämangiosarkom als häufigste Einzeldiagnose trugen insbesondere Barsoi, Afghane, Deutscher Schäferhund und Boxer ein hohes Risiko (Tabelle 4.1-56). Kein Risiko war für Pudel, Teckel und Terrier auszumachen. Die Disposition des Deutschen Schäferhundes für Hämangiosarkome ist vielfach dokumen-

Tabelle 4.1-53

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit Karzinomen im Sektionsgut

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	14	1,25	m	357	31,76
2	4	6	0,54	mk	27	2,4
4	6	21	1,88	w	671	59,7
6	8	89	7,95	wk	69	6,14
8	10	164	14,66	Summe	1124	100
10	12	303	27,08			
12	14	337	30,12			
14	16	145	12,96			
16	18	37	3,31			
18	20	3	0,27			
Summe		1119	100			

tiert (Brown, Patnaik, and MacEwen 1985; Frey and Betts 1977; Kleine, Zook, and Munson 1970; Oksanen 1978; Pearson and Head 1976; Prymak et al. 1988b; Srebernik and Appleby 1991).

Auch die Altersverteilung und die Geschlechtsdiposition der Rüden (Tabelle 4.1-57) bestätigt Ergebnisse anderer Untersucher (Frey and Betts 1977; Kleine, Zook, and Munson 1970; Kusch 1985; Prymak et al. 1988a; Srebernik and Appleby 1991).

Die dritthäufigste Tumorentität im Sektionsgut war das Maligne Lymphom mit einem Anteil von 13,8 % an allen Tumoren und 3,6 % an allen seziierten Hunden. Deutlich erhöhtes Risiko für Maligne Lymphome waren beim Berner Sennenhund, beim Hovawart, bei allen Schnauzerschlägen, beim Boxer und bei Mischlingshunden festzustellen, während Terrier-, Teckel- und Pudelschläge, sowie deutlich auch Yorkshire-Terrier statistisch gesehen nicht anfällig sind (Tabelle 4.1-58). Aus der Literatur bekannt sind mutmaßliche Dispositionen von Bull-Mastiff, Rottweiler, Airedale-Terrier, Boxer, Deutscher Schäferhund, Bas-

Tabelle 4.1-54

Rassenrisiko für Ausbildung von Sarkomen

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Barsoi	7	0,89	1,6	2,726	5,969	13,068
Boxer	67	8,56	31	1,917	2,49	3,235
DSH	213	27,2	121,8	1,844	2,17	2,554
Afghane	12	1,53	6,6	1,072	1,949	3,545
Pudel, insgesamt	43	5,49	62,8	0,474	0,649	0,888
Teckel	46	5,87	77,6	0,407	0,549	0,741
Terrier, insgesamt	30	3,83	84,6	0,22	0,312	0,443
Terrier, Yorkshire	8	1,02	40,9	0,095	0,176	0,328
Mix	158	20,18	161,6	Chi-Quadrat < 3,841		
Teckel	45	5,75	44,2	Chi-Quadrat < 3,840		
Übrige Rassen	154	19,67				
Summe	783	100				

Tabelle 4.1-55

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit Sarkomen im Sektionsgut

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	9	1,17	m	476	61,26
2	4	9	1,17	mk	17	2,19
4	6	35	4,56	w	260	33,46
6	8	88	11,46	wk	24	3,09
8	10	174	22,66	Summe	777	100
10	12	227	29,56			
12	14	157	20,44			
14	16	57	7,42			
16	18	12	1,56			
Summe		768	100			

set, Bernhardiner und Scottish Terrier (Bäckgren 1965; Couto 1985; Kusch 1985; Majzoub 1997; Onion 1984; Priester and McKay 1980; Teske et al. 1994).

Hunde mit Malignen Lymphomen wiesen einen relativ niedrigen Altersdurchschnitt von $8,322 \pm 3,599$ Jahren auf, wobei 56 % der Tumore in die Altersgruppen zwischen 6 und 12 Jahren fielen (Tabelle 4.1-59), bei leichter Akzentuierung von Rüden. Die Tatsache, daß Maligne Lymphome eher bei jüngeren Hunden beobachtet werden kann, ist vielfach dokumentiert, wobei meist eine Geschlechtsdisposition verneint wird (Bäckgren 1965; Greenlee et al. 1990; Haga et al. 1988; Schneider 1983; Teske 1994a; Teske 1994b; Van Pelt and Connor 1968); einige Untersucher sehen allerdings gehäuft Rüden (Capurro, Buracco, and Rossi 1992; Couto 1985; MacEwen et al. 1987; Parodi, Dargent, and Cres-

Tabelle 4.1-56

Rassenrisiko für Hämangiosarkome im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Barsoi	3	0,56	1,1	0,961	3,054	9,702
Afghane	12	2,24	4,5	1,642	2,941	5,268
DSH	172	32,15	83,2	2,285	2,742	3,29
Boxer	47	8,79	21,2	1,836	2,491	3,38
Pudel	27	5,05	42,9	0,405	0,597	0,881
Teckel	33	6,17	53	0,411	0,585	0,833
Terrier	22	4,11	57,8	0,227	0,342	0,516
Mix	122	22,8	110,4	Chi-Quadrat < 3,841		
Cocker Spaniel	21	3,93	30,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	76	14,21				
Summe	535	100				

Tabelle 4.1-57

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit Hämangiosarkomen im Sektionsgut

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht		
Von ()	bis (<)			n	%	
0	2	16	3,04	m	331	62,7
2	4	7	1,33	mk	8	1,5
4	6	15	2,85	w	183	34,3
6	8	53	10,06	wk	11	2,0
8	10	131	24,86	Total	533	100
10	12	154	29,22			
12	14	102	19,35			
14	16	40	7,59			
16	18	9	1,71			
Summe		527	100			

peau 1988).

Vierthäufigste Neoplasieart waren Melanome mit einem Anteil von 2,33 % an allen Tumoren und 0,61 % an allen seziierten Hunden. Insbesondere die Rassen Riesen-Schnauzer, Pekingese, Scotch-Terrier, Zwerg-Schnauzer, Teckel und Cocker Spaniel tragen offensichtlich ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Melanomen, während beim Deutschen Schäferhund nur ein negativer Zusammenhang zwischen Rasse und dieser Tumorart vorliegt (Tabelle 4.1-60).

Hunde mit Melanomen wurden durchschnittlich $11,470 \pm 2,816$ Jahre alt, wobei nahezu 50 % der Fälle in den Altersgruppen zwischen 10. und 14. Jahr auftraten

Tabelle 4.1-58

Rassenrisiko für Maligne Lymphome im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Sennenhund, Berner	4	0,98	1,5	1,054	2,836	7,63
Hovawart	5	1,22	2,2	1,006	2,452	5,977
Schnauzer, insgesamt	18	4,39	9,8	1,204	1,946	3,144
Boxer	26	6,34	16,2	1,122	1,681	2,519
Mix	110	26,83	84,6	1,145	1,43	1,786
Terrier, insgesamt	28	6,83	44,3	0,406	0,596	0,875
Teckel	25	6,1	40,7	0,388	0,581	0,87
Pudel	19	4,63	32,9	0,346	0,547	0,866
Terrier, Yorkshire-	11	2,68	21,4	0,272	0,491	0,887
DSH	62	15,12	63,8	Chi-Quadrat < 3,841		
Cocker Spaniel	27	6,59	23,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	75	18,29				
Summe	410	100				

Tabelle 4.1-59

Alters- und Geschlechtsverteilung der Hunde mit Malignen Lymphomen

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht	n	%
Von ()	bis (<)					
0	2	13	3,27	m	225	55,56
2	4	33	8,31	mk	13	3,21
4	6	50	12,59	w	155	38,27
6	8	59	14,86	wk	12	2,96
8	10	76	19,14	Summe	405	100
10	12	88	22,17			
12	14	56	14,11			
14	16	17	4,28			
16	18	5	1,26			
Summe		397	100			

Tabelle 4.1-60

Rasserrisiko für Ausbildung von Melanomen im Sektionsgut

Rasse	n	%	erwartete Häufigkeit	VB	OR	VB
Schnauzer, Riesen-	7	10,14	0,6	7,253	13,481	25,057
Pekingese	6	8,7	0,7	4,974	9,979	20,022
Terrier, Scotch-	2	2,9	0,2	2,609	8,633	28,564
Schnauzer, Zwerg-	2	2,9	0,4	1,413	5,089	18,331
Teckel	18	26,09	6,8	1,945	3,243	5,408
Cocker Spaniel	9	13,04	3,9	1,28	2,528	4,994
DSH	2	2,9	10,7	0,047	0,161	0,551
Mix	11	15,94	14,2	Chi-Quadrat < 3,841		
Übrige Rassen	12	17,39				
Summe	69	100				

(Tabelle 4.1-61). Melanome konnten am häufigsten bei Rüden beobachtet werden (Tabelle 4.1-61).

Abschließende Betrachtung

Obwohl in dieser Untersuchung eine Vielzahl von Daten zu möglichen Rassen-, Alters- und Geschlechtsdispositionen erhoben werden konnten, wäre eine Verallgemeinerung dieser Ergebnisse unzulässig. Denn: Auch statistisch abgesicherte veterinärmedizinische epidemiologische Untersuchungen zu Neoplasien sind wegen fehlender allgemeiner Zensusdaten mit sehr großen Fehlern behaftet und ermöglichen somit im engeren Sinne keine allgemeingültigen Aussagen über das Vorkommen von Neoplasien bei Hunden. Letztendlich ist es das Feh-

Tabelle 4.1-61
Alters- und Geschlechtsverteilung bei Hunden mit Melanomen

Altersgruppen in J.		n	%	Geschlecht	n	%
Von ()	bis (<)					
0	2	0	0	m	42	60,87
2	4	0	0	mk	2	2,9
4	6	0	0	w	21	30,43
6	8	7	10,14	wk	4	5,8
8	10	12	17,39	Summe	69	100
10	12	14	20,29			
12	14	20	28,99			
14	16	11	15,94			
16	18	5	7,25			
Summe		69	100			

len von amtlichen oder nur halbamtlichen Todesursachenstatistiken sowie von Tumorzentren die allgemeingültige epidemiologische Aussagen verhindern. Für reine Sektionsstatistiken kommt zusätzlich die nicht abschätzbare Gefahr durch nicht-randomisierte Fallauswahl, verursacht durch Unterschiede im Einsendeverhalten von Besitzern und einsendenden Tierärzten, welches abhängig ist vom Kenntnisstand der Einzelnen, sowie von Unterschieden zwischen Stadt- und Landbevölkerung, erschwerend hinzu. Zusätzlich beeinflussen allgemeine sozioökonomische Bedingungen und Grundeinstellungen zum Tier die Zusammensetzung des Sektionsmaterials und damit die Tumorstatistik in unbekanntem Ausmaß (Merlo, Capurro, and Cavanna 1995; Saracci 1993; Stünzi 1970; Stünzi 1972; Stünzi and Lott-Stolz 1965; von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973). Trotzdem wurde in dieser Untersuchung versucht, Minimalforderungen nach größtmöglicher Vergleichbarkeit von Sektionsstatistiken zu erfüllen (nur Sektionsmaterial wurde bewertet, Alters- Rassen- und Geschlechtsverteilungen wurden erhoben und eine einheitliche Nomenklatur wurde eingesetzt), welche unter anderen Dobberstein (1953; 1957) und Stünzi (1972; 1965) als Voraussetzungen ansahen, um überhaupt relevante Aussagen zur Problematik der Neoplasien treffen zu können. Problematisch bei dieser wie bei allen retrospektiven Untersuchungen über größere Zeiträume ist, daß in der Vergangenheit unvollständige Dokumentation und unterschiedliche Auffassungen und Bewertungen der Neoplasien (Veress et al. 1993) vorlagen, die Fehler implizierten, die auch nach Durchsicht, Überarbeitung und Reklassifizierung der Fälle nicht vollständig vermieden werden konnten.

Mit der Errechnung der Odds Ratio wurde ein objektivierbares Kriterium zur Abschätzung von Risikofaktoren (Rassen-, Alters- und Geschlechtsdispositionen) eingeführt, womit zumindest direkte Vergleiche zum Beispiel mit den Er-

gebnissen von Priester und MacKay (Priester and McKay 1980) möglich werden.

Jedoch können aufgrund der schon hinreichend erwähnten limitierenden Faktoren die Ergebnisse dieser Untersuchung nur Hinweise auf Tendenzen geben, die allerdings in vielen Details in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in der Literatur stehen.

Die notwendige Abklärung von darüber hinausgehenden Risikofaktoren, wie zum Beispiel Umweltfaktoren, erfordern intensive anamnestiche Erhebungen, die noch mehr von Referenzdaten abhängen als die hier untersuchten Faktoren (Misdorp 1996). Um die Aussagekraft derartiger Untersuchungen zu erhöhen, werden weitere vergleichbare statistische Evaluierungen benötigt, wobei ein umfassenderes Bild durch Verknüpfung von Klinik-, Sektions- und Biopsiestatistiken entstehen könnte. In Konsequenz bleibt nur, dringend die Einführung eines zentralen Tumorregisters für spontane Neoplasien zu fordern, wie es für Versuchstiere bereits besteht (Mohr et al. 1980), und sich mit anderen europäischen Ländern abzusprechen, wo solche Rahmenbedingungen teilweise bereits erfüllt sind (Arnesen, Gamlem, and Nordstoga 1990; Brouwer et al. 1995; Merlo, Capurro, and Cavanna 1995; Nordstoga et al. 1995). Nur so kann die sich erst entwickelnde veterinärmedizinische Onkologie in Europa auf eine breite und sichere Basis gestellt werden.

Danksagung

Frau Dr. Gisela Arndt vom Institut für Biometrie der FU Berlin ist für die kritischen und konstruktiven Diskussionen zum Thema zu danken.

Literaturverzeichnis

- Albert, R.R., S.A. Benjamin, and R. Shukla. 1994. Life span and cancer mortality in the Beagle dog and humans. *Mechanisms of Ageing and Development* 74:149-159.
- Arnesen, K., H. Gamlem, and K. Nordstoga. 1990. Registrering av nydannelser hos hund. *Norsk Veterinaertidsskrift* 102:40-41.
- Bäckgren, A.W. 1965. Lymphatic leucosis in dogs. An epizootological clinical and haematological study. *Acta Veterinaria Scandinavica* 6.
- Bailey, W. S. 1979. Spirocerca-associated esophageal sarcomas. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175:150.
- Baskin, G.B., and A. De Paoli. 1977. Primary renal neoplasms of the dog. *Veterinary Pathology* 14:591-605.

- Bastianello, S.S. 1983. A survey on neoplasie in domestic species over a 40-year period from 1953 to 1974 in Republic of South Afrika. VI. Tumours occuring in dogs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 50:199–250.
- Batamuzi, E. K., A. A. Kassuku, and J. F. Agger. 1992. Risk factors associated with canine transmissible venereal tumour in Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine* 13:13-17.
- Baumgärtner, W., and .PV. Peixoto. 1987. Immunohistochemical demonstration of keratin in canine neuroepithelioma. *Veterinary Pathology* 24:500 - 503.
- Beck, E. R., S. J. Withrow, A. E. McChesney, R. C. Richardson, R. A. Henderson, A. M. Norris, D. D. Caywood, J. S. Klausner, H. J. Harvey, and D. L. Holmberg. 1986. Canine tongue tumors: a retrospective review of 57 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 22:525-532.
- Bender, A. P. 1981. An epidemiologic study of canine multiple primary neoplasia. *Dissertation Abstracts International* 7:2508.
- Bender, A.P., C.R. Dorn, and R. Schneider. 1983. Quantitative index for diagnostic surveillance of neoplasms in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 44:395-398.
- Bender, A. P., C. R. Dorn, and R. Schneider. 1984. An epidemiologic study of canine multiple primary neoplasia involving the female and male reproductive systems. *Preventive Veterinary Medicine* 2:715-731.
- Bestetti, G., and G. L. Rossi. 1985. Islet cell carcinomas in dogs. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* 405:203-14.
- Birchard, S. J., C. G. Couto, and S. Johnson. 1986. Nonlymphoid intestinal neoplasia in 32 dogs and 14 cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 22:533-537.
- Boldizsár, H., O. Szenci, Muray T., and J. Csenki. 1992. Studies on canine mammary tumours. I. Age, seasonal and breed distribution. *Acta Veterinaria Hungarica* 40:75 - 87.
- Bostock, D.E. 1986. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Veterinary Journal* 142:1-19.
- Brearley, M. J., J. E. Cooper, and N. Wedderburn. 1986. Canine bladder cancer-a study of the spontaneous disease. *Animal Technology* 37:77-78.
- Breuer, W., F. Colbatzky, S. Platz, and W. Hermanns. 1993. Immunoglobulin-producing tumours in dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology*. 109:203-216.
- Brewer, W. G., Jr., E. Mitley, G. K. Ogilvie, A. Norris, L. E. Fox, W. B. Morrison, A. S. Hammer, D. Vail, and J. Berg. 1993. Canine digital tumors: retrospective review of 63 cases (1980-1990). A VCOG cooperative study - preliminary results. *Veterinary Cancer Society Newsletter* 17:7.
- Brodey, R. S. 1970a. The biological behaviour of canine oral and pharyngeal neoplasms. *Journal of Small Animal Practice* 11:45-53.
- Brodey, R. S. 1970b. Canine and feline neoplasia. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 14:309-354.

- Brodey, R.S. 1979. The use of naturally occurring cancer in domestic animals for research into human cancer: general considerations and a review of canine skeletal osteosarcoma. *Yale Journal of Biology and Medicine* 52:345-361.
- Brodey, R. S., and P. H. Craig. 1965. Primary pulmonary neoplasms in the dog: a review of 29 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 147:1628-1643.
- Brodey, R.S., and J.F. Roszel. 1967. Neoplasms of the canine uterus, vagina and vulva: a clinicopathological survey of 90 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 151:1294-1307.
- Bronson, R.T. 1982. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *American Journal of Veterinary Research* 43:2057 - 2059.
- Brouwer, H., E. G. Schouten, J. P. Noordhuizen, and P. F. van Voorthuysen. 1995. Mogelijkheden van epidemiologisch onderzoek via de geautomatiseerde praktijkadministratie van dierenartsen. [Possibilities of epidemiological studies via automated veterinary practice administration]. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 120:296-9.
- Brown, N.O., A.R. Patnaik, and E.G. MacEwen. 1985. Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 186:56 - 58.
- Brunnert, S. R., L. A. Dee, A. J. Herron, and N. H. Altman. 1992. Gastric extramedullary plasmacytoma in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200:1501-1502.
- Burnie, A. G., and A. D. Weaver. 1983. Urinary bladder neoplasia in the dog: a review of seventy cases. *Journal of Small Animal Practice* 24:129-145.
- Busch, U. 1993. Immunohistochemischer Nachweis okkultes Tumorzellemboli und Mikrometastasen in regionären Lymphknoten von Hündinnen mit Mammakarzinomen. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin.
- Capen, C.C., S.L. Martin, and A. Koestner. 1967. Neoplasms in the adenohypophysis of dogs. *Pathologica Veterinaria* 4:301-325.
- Capurro, C., P. Buracco, and L. Rossi. 1992. Lymphoma in dogs. *European Journal of Companion Animals* 2:7-19.
- Carb, A. V., and D. G. Goodman. 1973. Oesophageal carcinoma in the dog. *Journal of Small Animal Practice*:91-99.
- Carpenter, J.L., Y. Dayal, N.W. Jr. King, and F.M. Moore. 1991. Distinctive unclassified mesenchymal tumor of the digit of dogs. *Veterinary Pathology* 28:396 - 402.
- Chiti, L., and E. I. Amber. 1992. Incidence of tumours seen at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zambia: a four year retrospective study. *Zimbabwe Veterinary Journal* 23:145-147.
- Cobbold, S., and S. Metcalfe. 1994. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the first international canine leukocyte antigen workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 43:137-154.

- Cohen, D., J.S. Reif, R.S. Brodey, and H. Keiser. 1974. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Research* 34:2859-2868.
- Cotchin, E. 1972. Comparative oncology. Neoplasms of interest to medical and veterinary pathologist. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* 7 (Supl.):1 - 16.
- Couto, C. G. 1985. Canine lymphomas: something old, something new. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 7:291-299.
- Couto, C. G., J. Cullen, V. Pedroia, and J. M. Turrel. 1984. Central nervous system lymphosarcoma in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 184:809-813.
- Couto, C. G., H. C. Rutgers, R. G. Sherding, and J. Rojko. 1989. Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 3:73-78.
- Crow, S. E. 1985. Urinary tract neoplasms in dogs and cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 7.
- Culbertson, R., J. E. Branam, and L. S. Rosenblatt. 1983. Esophageal/gastric leiomyoma in the laboratory Beagle. *J Am Vet Med Assoc* 183:1168-71.
- Dahme, E. 1968. Vergleichende Betrachtung über Morphologie und Genese von Neoplastomen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B* 15:15-22.
- Dobberstein, J. 1953. Zur Statistik der Geschwülste bei Tieren. Vol. 3, Sitzungsbericht Deutsche Akademie der Wissenschaften. Berlin.
- Dobberstein, J. 1957. Vergleichende Onkologie. *Therapeutische Berichte* 29:271-275.
- Donnay, I., J. Ravis, and J. Verstegen. 1994. Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. Etude épidémiologique. *Annales de Médecine Vétérinaire* 138:109-117.
- Dorn, C.R., and W.A. Priestler. 1976. Epidemiologic analysis of oral and pharyngeal cancer in dogs cats horses, and cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 169:1202 - 1206.
- Dorn, C. R., D. O. Taylor, L. E. Chaulk, and H. H. Hibbard. 1966. The prevalence of spontaneous neoplasms in a defined canine population. *American Journal of Public Health* 56:254-65.
- Dorn, C.R., D.O.N. Taylor, and H.H. Hibbard. 1967. Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *American Journal of Veterinary Research* 28:993-1001.
- Dorn, C.R., O.N. Taylor, F.L. Frye, and H.H. Hibbard. 1968a. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *Journal of the National Cancer Institute* 40:295 - 305.
- Dorn, C.R., O.N. Taylor, R. Schneider, H.H. Hibbard, and M.R. Klauber. 1968b. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* 40:307 - 318.

- Durham, S. K., and A. E. Dietze. 1986. Prostatic adenocarcinoma with and without metastasis to bone in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 188:1432-1436.
- Dutton, J.E., and G.E. Moore. 1987. Clinical reviews of death/euthanasia in 123 military working dog necropsies. *Military Medicine* 152:489-493.
- Ebel, L. 1984. Todesursachen bei Hundewelpen, untersucht im Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover von 1973 bis 1980. Inaugural-Dissertation, Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Eichelberg, H., and R. Seine. 1996. Lebenserwartung und Todesursachen bei Hunden. I. Zur Situation bei Mischlingen und verschiedenen Rassehunden. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 109:292-303.
- Elsinghorst, T. A., H. J. Timmermans, and H. G. Hendriks. 1984. Comparative pathology of endometrial carcinoma. *Veterinary Quarterly* 6:200-8.
- Er, J.C., and R.H. Sutton. 1989. A survey of skin neoplasms in dogs from the Brisbane region. *Australian Veterinary Journal* 66:225 - 227.
- Eskens, U. 1983. Statistische Untersuchungen nach den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifizierte Geschwülste des Hundes unter besonderer Berücksichtigung der Mamma- und Hauttumoren. Inaugural-Dissertation, FB Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Estrada, M. M. de, A. L. Parodi, M. M. De Estrada, and M. Miranda de Estrada. 1983. Tumeurs épithéliales du tractus gastrointestinal chez le chien. Étude rétrospective. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 159:709-717.
- Etreby, M. F. el, R. Müller-Peddinghaus, A. S. Bhargava, G. Trautwein, and M. F. El Etreby. 1980. Functional morphology of spontaneous hyperplastic and neoplastic lesions in the canine pituitary gland. *Veterinary Pathology* 17:109-122.
- Evans, S. M., M. Goldschmidt, L. J. McKee, and C. E. Harvey. 1989. Prognostic factors and survival after radiotherapy for intranasal neoplasms in dogs: 70 cases (1974-1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 194:1460-1463.
- Fajardo, L. F. 1994. Lymph nodes and cancer. A review. *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology* 28:1-10.
- Fenner, W. R. 1990. Metastatic neoplasms of the central nervous system. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal* 5:253-261.
- Ferguson, H.R. 1985. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 15:501-511.
- Fidler, I.J., and R.S. Brodey. 1967. A necropsy study of canine malignant mammary neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 151:710-715.
- Fischer, K. 1967. Subependymale Zellproliferationen und Tumordisposition brachycephaler Hunderassen. *Acta Neuropathologica (Berlin)* 8:242-254.

- Fonda, D., M. Gualtieri, and E. Scanziani. 1989. Gastric carcinoma in the dog: a clinicopathological study of 11 cases. *Journal of Small Animal Practice* 30:353-360.
- Foster, E. S., J. M. Carrillo, and A. K. Patnaik. 1988. Clinical signs of tumors affecting the rostral cerebrum in 43 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2:71-74.
- Frese, K. 1985. Vergleichende Pathologie der Mammatumoren bei Haustieren. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 69:152-170.
- Frese, K., U. Eskens, and H. Frank. 1982. Hauttumoren des Hundes. Pathologie, klinische und differentialdiagnostische Aspekte. Paper read at 28. Jahrestagung der Fachgruppe Kleintierkrankheiten, 14.-16. Oktober 1982, at Frankfurt/Main.
- Frese, K., H. Frank, and U. Eskens. 1983. Plattenepithelkarzinome der Zehen beim Hund. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 90:359-363.
- Frey, A. J., and C. W. Betts. 1977. A retrospective survey of splenectomy in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 13:730-734.
- Garbe, P. L. 1988. The companion animal as a sentinel for environmentally related human diseases. *Acta Veterinaria Scandinavica Suppl* 84:290-2.
- Gart, J.J. 1970. Point and interval estimation of the common odds ratio in the combination of 2x2 tables with fixed margins. *Biometrika* 57:471 - 475.
- Geisel, O. 1980. Primäre Lungensarkome beim Hund. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 93:174-177.
- Geisel, O., S. Kusch, M. Geisenberger, and W. Hermanns. 1990. The incidence of malignant neoplasms of the dog in a 40-year period (1950-1989) in Munich. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 132:429.
- Geisenberger, M. 1990. Erhebungen über das Vorkommen bösartiger Tumoren beim Hund anhand der Sektionsstatistik des Instituts für Tierpathologie, München, 1951-1969. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Geyer, C., A. Hafner, S. Pflüghaar, and W. Hermanns. 1992. Immunohistochemical and ultrastructurell investigation of granular cell tumours in dog, cat, and horse. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 39:485 - 494.
- Gibbs, C., and H. Pearson. 1986. Localized tumours of the canine small intestine: a report of twenty cases. *Journal of Small Animal Practice* 27:507-519.
- Goedegebuure, S. A. 1979. Secondary bone tumours in the dog. *Veterinary Pathology* 16:520-529.
- Goldschmidt, M. H., and F. S. Shofer. 1992. *Skin tumors of the dog and cat*. 1st ed. Oxford, New York: Pergamon Press.
- Greenlee, P.G., D.A. Filippa, F.W. Quimby, A.K. Patnaik, S.E. Calvano, R.E. Matus, M.K. Kimmel, A.I. Hurvitz, and P.H. Liebermann. 1990. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 66:480 - 490.

- Gutberlet, K. 1994. Mammatumoren bei Hunden: Immunhistochemische Darstellung von Gefäßendothel bei Krebszelleinbrüchen und Überarbeitung der WHO-Klassifikation. Inaugural-Dissertation, FB Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin.
- Gutsche, W. 1964. Sektionsstatistik der Hundekrankheiten aus dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover von 1938 bis 1963. Inaugural-Dissertation, Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Haga, T., K. Yokomori, H. Nakayama, T. Hayashi, N. Goto, R. Takahashi, and K. Jujiwara. 1988. Canine and feline lymphoid and myeloid tumors encountered in Tokyo. *Japanese Journal of Veterinary Science* 50:809-813.
- Hahn, F. F., B. A. Muggenburg, and W. C. Griffith. 1996. Primary lung neoplasia in a Beagle colony. *Veterinary Pathology* 33:633-638.
- Hahn, K. A., L. Bravo, W. H. Adams, and D. L. Frazier. 1994. Naturally occurring tumors in dogs as comparative models for cancer therapy research. *In Vivo* 8:133-43.
- Halmi, NS, ME Peterson, GJ Colurso, AS Liotta, and DT Krieger. 1981. Pituitary intermediate lobe in dog: two cell types and high bioactive adrenocorticotropin content. *Science* 211:72-74.
- Hamilton, J. M. 1974. Comparative aspects of mammary tumors. *Advances in Cancer Research* 19:1-45.
- Hampe, J.F., and W. Misdorp. 1974. IX. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization* 50:111 - 133.
- Hänichen, T., and B. Schiefer. 1968. Zur Morphologie und Häufigkeit primärer Geschwülste der Nasenhöhlen und Nasennebenhöhlen bei Hund und Katze. *Zeitschrift für Krebsforschung* 71:255-66.
- Harris, N.L., E.S. Jaffe, H. Stein, P.M. Banks, J.K.C. Chan, M.L. Cleary, G. Delson, C. De Wolf-Peters, B. Falini, K.C. Gatter, T.M. Grogan, P.G. Isaacson, D.M. Knowles, D.Y. Mason, H.-K. Müller-Hermelink, S.A. Pileri, M.A. Piris, E. Ralfkiaer, and R.A. Warnke. 1994. A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84:1361 - 1392.
- Hawkins, K.L., B.A. Summers, F.P. Kuhajda, and C.A. Smith. 1987. Immunocytochemistry of normal pancreatic islets and spontaneous islet cell tumors in dogs. *Veterinary Pathology* 24:170-179.
- Hayden, D. W., and S. W. Nielsen. 1973. Canine alimentary neoplasia. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 1:1-22.
- Hayes, H. M., Jr., and J. F. Fraumeni, Jr. 1975. Canine thyroid neoplasms: epidemiologic features. *Journal of the National Cancer Institute* 55:931-934.
- Hayes, H. M., Jr., and J. F. Fraumeni, Jr. 1977. Epidemiological features of canine renal neoplasms. *Cancer Research* 37:2553-2556.
- Hayes, H.M., and T.W. Pendergrass. 1976. Canine testicular tumors: epidemiologic features of 410 dogs. *International Journal of Cancer* 18:482 - 487.

- Hayes, H. M., W. A. Priester Jr, and T. W. Pendergrass. 1975. Occurrence of nervous-tissue tumors in cattle, horses, cats and dogs. *International Journal of Cancer* 15:39-47.
- Hayes, H. M., Jr., and G. P. Wilson. 1977. Hormone-dependent neoplasms of the canine perianal gland. *Cancer Research* 37:2068-2071.
- Hayes, H. M., Jr., G. P. Wilson, and J. F. Fraumeni, Jr. 1982. Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs: descriptive epidemiology. *Cornell Veterinarian* 72:168-179.
- Hayes, H. M., Jr., and J. L. Young, Jr. 1978. Epidemiologic features of canine ovarian neoplasms. *Gynecologic Oncology* 6:348-353.
- Head, K. W., and R. W. Else. 1981. Neoplasia and allied conditions of the canine and feline intestine. *Veterinary Annual* 21:190-208.
- Howard, E. B., and S. W. Nielsen. 1965. Neoplasia of the boxer dog. *American Journal of Veterinary Research* 26:1121-1131.
- Hoyt, R. F., Jr., and S. J. Withrow. 1984. Oral malignancy in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 20:83-92.
- Ivoghli, B. 1978. Esophageal sarcomas associated with canine spirocercosis. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* 73:47-49.
- Jacob, K.L. 1959. Cerebrale Gliome bei Hunden. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 10:945-962.
- Jarett, W.F.H., and L. Mackey. 1974. II. Neoplastic diseases of the haematopoetic and lymphoid tissues. *Bulletin of the World Health Organization* 50:21 - 34.
- Jongeward, S. J. 1985. Primary bone tumors. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 15:609-641.
- Jösten, M. 1995. Differenzierung zwischen Geschwulst-Riesenzellen und osteoklastenähnlichen Riesenzellen in Neoplasien von Katzen und Hunden am immun- und enzymhistochemisch gefärbten Paraffinschnitt. Inaugural-Dissertation, FB Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin.
- Kapatkin, A. S., H. S. Mullen, D. T. Matthiesen, and A. K. Patnaik. 1992. Leiomyosarcoma in dogs: 44 cases (1983-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201:1077-1079.
- Kim, D. Y., E. C. Hodgins, D. Y. Cho, and J. E. Varnado. 1996. Juvenile rhabdomyosarcomas in two dogs. *Veterinary Pathology* 33:447-450.
- Klein, M. K., G. L. Cockerell, C. K. Harris, S. J. Withrow, J. P. Lulich, G. K. Ogilvie, A. M. Norris, H. J. Harvey, R. F. Richardson, J. D. Fowler, J. Tomlinson, and R. A. Henderson. 1988. Canine primary renal neoplasms: a retrospective review of 54 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 24:443-452.
- Kleine, L.J., B.C. Zook, and T.O. Munson. 1970. Primary cardiac hemangiosarcomas in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 157:326 - 337.
- Knecht, C. D., and W. A. Priester. 1978. Musculoskeletal tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172:72-74.

- Kolbjornsen, O., C. M. Press, and T. Landsverk. 1994. Gastropathies in the Lunde hund. I. Gastritis and gastric neoplasia associated with intestinal lymphangiectasia. *Apmis* 102:647-661.
- Kosugi, K. 1973. Beitrag zur Statistik der Geschwülste bei den Haussäugetieren. Inaugural-Dissertation, FB Veterinärmedizin, Justus Liebig-Universität, Gießen.
- Krauser, K. 1985. Neoplasien des Magens beim Hund. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 98:48-53.
- Krawiec, D. R. 1991. Canine bladder tumors: the incidence, diagnosis, therapy, and prognosis. *Veterinary Medicine* 86:47-54.
- Krook, L. 1954. A statistical investigation of carcinoma in the dogs. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A Pathology* 35:407-422.
- Krotje, L.J., W.A. Ware, and Y. Niyo. 1990. Intracardiac rhabdomyosarcoma in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197:368 - 371.
- Kuntscher, Rudolf. 1979. Retrospektive Erhebungen an Knochenblastomen beim Hund. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Kurzman, I. D., and S. R. Gilbertson. 1986. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 1:25-32.
- Kusch, Susanne. 1985. Erhebungen über das Vorkommen bösartiger Blastome beim Hund anhand der Sektionsstatistik des Institutes für Tierpathologie, München, 1970-1984. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Kydd, D. M., and A. G. Burnie. 1986. Vaginal neoplasia in the bitch: a review of forty clinical cases. *Journal of Small Animal Practice* 17:255-263.
- Landes, C., and J. von Sandersleben. 1985. Primäre Neoplasien und Schleimhauthyperplasien im Magen des Hundes. *Tierärztliche Praxis Suppl.* 1:139-58.
- Leifer, C.E., M.E. Peterson, and R.E. Matus. 1986. Insulin-secreting tumor: diagnosis and medical and surgical management in 35 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 188:60-64.
- Lipowitz, A. J., A. Schwartz, G. P. Wilson, and J. W. Ebert. 1973. Testicular neoplasms and concomitant clinical changes in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 163:1364-1368.
- Lucke, V.M., and D.F. Kelly. 1976. Renal carcinoma in the dog. *Veterinary Pathology* 13:264-276.
- Luginbühl, H. 1963. Comparative aspects of tumors of the nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 108:702-721.
- Luginbühl, H., R. Fankhauser, and J.T. McGrath. 1968. Spontaneous neoplasms of the nervous system in animals. In *Progress in neurological surgery*, edited by H. Krayenbühl, P. E. Maspes and W. H. Sweet. Basal and Chicago: Karger and Year.

- MacEwen, E.G. 1990. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews* 9:125-136.
- MacEwen, E.G., A.A. Hayes, R.E. Matus, and I. Kurzman. 1987. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog. 147 cases (1978-1981). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 190:564-568.
- MacVean, D.W., A.W. Monlux, P.S. Anderson, S.L. Silberg, and J.F. Roszel. 1978. Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology* 15:700 - 715.
- Madewell, B, J Lund, R Munn, and M Pino. 1988. Canine laryngeal rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 50:1079 - 1084.
- Madewell, B. R., W. A. Priester, E. L. Gillette, and S. P. Snyder. 1976. Neoplasms of the nasal passages and paranasal sinuses in domesticated animals as reported by 13 veterinary colleges. *American Journal of Veterinary Research* 37:851-856.
- Magunna, E., and M. Mehring. 1966. Zur Häufigkeit des Rektumkarzinoms beim Hund. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 73:268.
- Majzoub, M. 1997. Histologische und immunhistologische Untersuchungen zur Organverteilung maligner Lymphome bei Hund und Katze. Inaugural-Dissertation, Institut für Tierpathologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Mantel, N. 1963. Chi-square test with one degree of freedom, extension of the Mantel-Haenszel procedure. *Journal of the American Statistic Association* 58:690-700.
- Mantel, N., and W. Haenszel. 1959. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *Journal of the National Cancer Institute* 22:719-748.
- Martin, J. L. 1977. Contribution a l'étude épidémiologique des cancers bucco-pharynges du chien et du chat. These, Ecole Nationale Veterinaire, Alfort.
- Mattix, ME, RJ Mattix, BH Williams, JL Ribas, and CL Wilhelmsen. 1994. Olfactory ganglioneuroblastoma in a dog: a light, ultrastructural, and immunohistochemical study. *Veterinary Pathology*. 31:262 - 265.
- Matus, R. E., and C. E. Leifer. 1985. Immunoglobulin-producing tumors. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 15:741-53.
- McCaw, D., M. Pratt, and R. Walshaw. 1980. Squamous cell carcinoma of the esophagus in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 16:561-563.
- Mcpheeron, M.A. 1992. Colorectal Leiomyomas in 7 Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 28:43 - 46.
- Merlo, F., C. Capurro, and M.T. Cavanna. 1995. Animal Tumor Registry. Paper read at 1st World Conference on Spontaneous Animal Tumors, April 28-30, 1995, at Genoa, Italy.
- Miles, K. G. 1988. A review of primary lung tumors in the dog and cat. *Veterinary Radiology* 29:122-128.

- Miles, K. G., J. C. Lattimer, A. E. Jergens, and G. F. Krause. 1990. A retrospective evaluation of the radiographic evidence of pulmonary metastatic disease on initial presentation in the dog. *Veterinary Radiology* 31:79-82.
- Misdorp, W. 1988. Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Veterinary Quarterly* 10:26-33.
- Misdorp, W. 1990. Genral Considerations. In *Tumors in Domestic Animals*, edited by J. E. Moulton. Berkeley: University of California Press.
- Misdorp, W. 1996. Veterinary cancer epidemiology. *Veterinary Quarterly* 18:32-36.
- Misdorp, W., and A.A.M. Hart. 1979. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* 62:537-545.
- Mohr, U., R. Bader, H. Ernst, R. Ettlin, C. Gembardt, J.H. Harleman, F. Hartig, W. Jahn, G. Kaliner, and E. Karbe. 1980. Tumor Registry Data Base. Suggestions for a systematized nomenclature of pre-neoplastic and neoplastic lesions in rats. *Experimental Pathology* 38:1-18.
- Moore, F.M., Y. Dayal, and J.C. Shelton. 1985. Pancreatic endocrine tumors in dogs: an immunohistochemical analysis [abstract]. *Laboratory Investigation* 52:44A.
- Moore, M. P., R. S. Bagley, M. L. Harrington, and P. R. Gavin. 1996. Intracranial tumors. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 26:759-777.
- Moulton, J.E. 1990a. *Tumors in Domestic Animals*. 3rd ed. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press.
- Moulton, J.E. 1990b. Tumors of the Mammary Gland. In *Tumors in Domestic Animals*, edited by J. E. Moulton. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press.
- Mulas, J. Martin de las , J.C. Gómez-Villamandos, E. Mozos, C. Morales, and A. Jover. 1994. Digital fetal rhabdomyoma in a dog. *European Journal of Veterinary Pathology* 1:15-18.
- Ndiritu, C. G. 1979. Lesions of the canine penis and prepuce. *Mod Vet Pract* 60:712-5.
- Nielsen, S.W., and J. Aftosmis. 1964. Canine perineal tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 144:127-135.
- Nielsen, S.W., and A. Horava. 1960. Primary pulmonary tumors of the dog. *American Journal of Veterinary Research* 21:813-830.
- Nielsen, S.W., and J.E. Moulton. 1990. Tumors of the Urinary System. In *Tumors in Domestic Animals*, edited by J. E. Moulton. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press.
- Nieto, J. M., M. Pizarro, and J. J. Fontaine. 1989. Tumeurs testiculaires du chien. Aspects épidémiologiques et anatomopathologiques. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 165:449-453.
- Nordstoga, K., K. Arnesen, H. Gamlem, E. Glattre, J. Grondalen, and L. Moe. 1995. Krefst hos hund. *Norsk Norsk-Veterinaertidsskrift* 107:411-420.
- Norris, A. M. 1979. Intranasal neoplasms in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 15:231-236.

- Norris, A. M., E. J. Laing, V. E. Valli, S. J. Withrow, D. W. Macy, G. K. Ogilvie, J. Tomlinson, D. McCaw, G. Pidgeon, and R. M. Jacobs. 1992. Canine bladder and urethral tumors: a retrospective study of 115 cases (1980-1985). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 6:145-53.
- Nothelfer, B. 1993. Vergleichende pathologisch-anatomische, histologische und immunzytochemische Untersuchungen insbesondere der Hypophysen bei Hunden mit spontanem Hyperkortizismus mit und ohne Lysodren®-Medikation. Inaugural-Dissertation, FB Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin.
- Nothelfer, H. B., and K. Weinhold. 1992. Formale Pathogenese, Durchschnittsalter und Rassenverteilung im Vergleich 61 Lysodren®-behandelter und 36 unbehandelter Fälle von caninem Hyperadrenokortizismus, die in den Jahren 1975 bis 1991 am Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin seziiert wurden. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 105:305-311.
- O'Brien, T.D., D.W. Hayden, T.P. O'Leary, D.D. Caywood, and K.H. Johnson. 1987. Canine pancreatic endocrine tumors: immunohistochemical analysis of hormone content and amyloid. *Veterinary Pathology* 24:308-314.
- Ogilvie, G. K., W. M. Haschek, S. J. Withrow, R. C. Richardson, H. J. Harvey, R. A. Henderson, J. D. Fowler, A. M. Norris, J. Tomlinson, D. McCaw, J. S. Klausner, R. W. Reschke, and B. C. McKiernan. 1989. Classification of primary lung tumors in dogs: 210 cases (1975-1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195:106-108.
- Oksanen, A. 1978. Haemangiosarcoma in dogs. *Journal of Comparative Pathology* 88:585-595.
- Onion, D.E. 1984. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* 72:909-912.
- Osborne, C.A., V. Perman, J.H. Sautter, J.B. Stevens, and G.F. Hanlon. 1968. Multiple Myeloma in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 153:1300-1319.
- Otto, P. 1992. Untersuchungen an Hunden mit Inselzelltumoren: Immunhistochemische Darstellung von Hormonen in den Tumorzellen; Vergleich mit der Insulin- und Glukosekonzentration im Patientenserum. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin.
- Palmer, A. C. 1976. Comparative aspects of tumours of the central nervous system in the dog. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 69:49-51.
- Parodi, A.L., F. Dargent, and F. Crespeau. 1988. Histological classification of canine malignant lymphomas. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 35:178 - 192.
- Patnaik, A. K. 1989. Canine sinonasal neoplasms: soft tissue tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 25:491-497.
- Patnaik, A. K., and P. G. Greenlee. 1987. Canine ovarian neoplasms: a clinicopathologic study of 71 cases, including histology of 12 granulosa cell tumors. *Veterinary Pathology* 24:509-514.

- Patnaik, A. K., A. I. Hurvitz, and G. F. Johnson. 1977. Canine gastrointestinal neoplasms. *Veterinary Pathology* 14:547-555.
- Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, and P.H. Lieberman. 1980. Canine hepatic neoplasms: a clinicopathologic study. *Veterinary Pathology* 17:553-564.
- Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, P.H. Liebermann, and G.F. Johnson. 1981a. Canine bile duct carcinoma. *Veterinary Pathology* 18:439-444.
- Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, P.H. Liebermann, and G.F. Johnson. 1981b. Canine hepatocellular carcinoma. *Veterinary Pathology* 18:427-438.
- Patnaik, A. K., W. J. Kay, and A. I. Hurvitz. 1986. Intracranial meningioma: a comparative pathologic study of 28 dogs. *Veterinary Pathology* 23:369-373.
- Patnaik, A. K., P. H. Lieberman, R. A. Erlandson, and S. K. Liu. 1984. Canine sinonasal skeletal neoplasms: chondrosarcomas and osteosarcomas. *Vet-Pathol* 21:475-482.
- Pearson, G. R., and K. W. Head. 1976. Malignant haemangioendothelioma (angiosarcoma) in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 17:737-745.
- Pfeil, C., and G. Loupal. 1984. Tumoren im Darmtrakt des Hundes. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 31:146-59.
- Phangcho, C. V., B. M. Dutta, and A. Mukit. 1990. Incidence of canine neoplasms in Assam. *Indian Veterinary Journal* 67:881-882.
- Pospischil, A., and T. Gerbig. 1982. Insulinome des Hundes. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 95:331-333.
- Poste, G., and I.J. Fidler. 1980. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283:139-146.
- Prange, H., G. Falk Junge, D. Katenkamp, E. Schneider, and M. Zieger. 1988. Zur Verbreitung, Epizootiologie und Röntgendiagnostik intrathorakaler Geschwülste beim Hund. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* 42:637-649.
- Prange, H., D. Katenkamp, G. Baumann, G. Falk-Junge, and H. Kosmehl. 1986. Die Pathologie der Hodentumoren des Hundes. 1. Mitteilung: Epidemiologie und vergleichend-epidemiologische Aspekte. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* 40:555-565.
- Priester, W.A. 1973. Skin tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *Journal of the National Cancer Institute* 50:457-466.
- Priester, W. A. 1974. Pancreatic islet cell tumors in domestic animals. Data from 11 colleges of veterinary medicine in the United States and Canada. *Journal of the National Cancer Institute* 53:227-9.
- Priester, W.A., and N. Mantel. 1971. Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *Journal of the National Cancer Institute* 47:1333 - 1344.

- Priester, William A., and Frank W. McKay. 1980. *The occurrence of tumors in domestic animals*. Edited by J. L. Ziegler. Vol. 54, *National Cancer Institute Monograph*. Bethesda: National Institutes of Health.
- Prymak, C., L. McKee, M. Goldschmidt, and L. Glickman. 1988a. Hemangiosarcoma and hematoma of the canine spleen: epidemiologic, clinical, pathologic and prognostic characteristics. *Veterinary Surgery* 17:38-39.
- Prymak, C., L.J. McKee, M.H. Goldschmidt, and L.T. Glickman. 1988b. Epidemiologic, clinical pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcomas and splenic hematoma in dogs: 217 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193:706 - 712.
- Rahko, T. 1968. A statistical study on the tumours of dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 9:328-49.
- Rallis, T., A. Koutinas, S. Lekkas, and C. Papadiamantis. 1992. Lymphoma (malignant lymphosarcoma) in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 33:590 - 596.
- Raymond, W.A., and A.S.Y. Leong. 1989. Immunoperoxidase staining in the detection of lymph node metastasis. *Pathology* 21:11-15.
- Reif, J. S., and D. Cohen. 1971. The environmental distribution of canine respiratory tract neoplasms. *Archives of environmental Health* 22:136-40.
- Reifinger, M. 1988. Statistische Untersuchungen zum Vorkommen von Hodentumoren bei Haussäugetieren. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 35:63 - 72.
- Ribas, J. L., J. L. Carpenter, H. Mena, F. Y. Schulman, and K. Lee. 1991. Central nervous system meningioma in the dog: a review of 50 cases. *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology* 50:373.
- Ridgway, R. L., and P. F. Suter. 1979. Clinical and radiographic signs in primary and metastatic esophageal neoplasms of the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 174:700-704.
- Rivera, R. Y. R., and W. W. Carlton. 1992. Lingual rhabdomyoma in a dog. *Journal of Comparative Pathology* 106:83-87.
- Rosenberg, J.T. Ross, T.D. Scavelli, D.T. Matthiesen, and A.K. Patnaik. 1991. Adenocarcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: a review of 32 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 27:349 - 355.
- Rosenbruch, M., and H. Klein. 1980. Vergleich von klinischen und pathomorphologischen Befunden bei Brusthöhlentumoren des Hundes. *Kleintierpraxis* 25.
- Rostami, M., S. Tateyama, K. Uchida, H. Naitou, R. Yamaguchi, and H. Otsuka. 1994. Tumors in domestic animals examined during a ten-year period (1980 to 1989) at Miyazaki University. *Journal of Veterinary Medical Science* 56:403-405.
- Russel, R.G., and M. Walker. 1983. Metastatic and invasive tumors of bone in dogs and cat. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 13:163-180.
- Sachs, Lothar. 1992. *Angewandte Statistik*. 7. ed. Berlin: Springer-Verlag.
- Saracci, R. 1993. Problems with the use of autopsy results as a yardstick in medical audit and epidemiology. *Quality Assurance Health Care* 5:339-344.

- Sarnelli, R., F. Grassi, and S. Romagnoli. 1994. Alveolar rhabdomyosarcoma of the greater omentum in a dog. *Veterinary Pathology* 31:473 - 475.
- Sasco, A.J. 1991. Epidemiologie comparee des cancers: un concept nouveau, un potentiel d'avenir. *Sciences Veterinaires Medecine Comparee* 93:1-2, 3-13.
- Scanziani, E., A. M. Giusti, M. Gualtieri, and D. Fonda. 1991. Gastric carcinoma in the Belgian Shepherd dog. *Journal of Small Animal Practice* 32:465-469.
- Scarlett, J. M. 1994. Epidemiology of thyroid diseases of dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 24:477-486.
- Schneider, R. 1970. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 26:419 - 426.
- Schneider, R. 1983. Comparison of age- and sex-specific incidence rate patterns of the leukemia complex in the cat and the dog. *Journal of the National Cancer Institute* 70:971 - 977.
- Schneider, R., C. R. Dorn, and M. R. Klauber. 1968. Cancer in households. A human-canine retrospective study. *Journal of the National Cancer Institute* 41:1285-92.
- Schulz, L.-Cl. 1958. Vergleichende Betrachtungen zum Sarkomfall bei Mensch und Hund. *Zeitschrift für Krebsforschung* 62:278-290.
- Schwartz-Porsche, D., C. Zwicker, H. Weiler, and A. Stolle. 1992. Riechschleimhauttumor (Ästhesioneuroepitheliom) mit ZNS-Einbruch beim Hund - eine Fallstudie mit kernspintomographischer Tumordarstellung. *Kleintierpraxis* 37:679-682.
- Schwarz, P. D., and R. L. Willer. 1989. Urinary bladder neoplasia in the dog and cat. *Problems in Veterinary Medicine* 1:128-140.
- Sedelmeier, H., and E. Weiss. 1963. Hauttumoren bei Hund und Katze. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 76:181-185.
- Seeliger, H., and P. Welzien. 1992. Ästhesioneurogener Tumor bei einem Hund. *Pathologie* 13:110-113.
- Slyter, M.V., T.R. Boosinger, R.R. Pool, K. Dämmrich, W. Misdorp, and S. Larsen. 1994. Histological Classification of Bone and Joint Tumors of Domestic Animals. Vol. I, Second Series, World Health Organization: International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology.
- Smith, D.W. 1996. Cancer mortality at very old ages. *Cancer* 77:1367-1372.
- Srebernik, N., and E.C. Appleby. 1991. Breed prevalence and sites of haemangioma and haemangiosarcoma in dogs. *Veterinary Record* 129:408-409.
- Statistisches Bundesamt. 1981-1996. Sterbefälle. Fachserie 12, Reihe 4. Wiesbaden.
- Steinberg, H., R. R. Dubielzig, J. Thomson, and G. Dzata. 1995. Primary gastrointestinal lymphosarcoma with epitheliotropism in three Shar-pei and one Boxer dog. *Veterinary Pathology* 32:423-426.
- Strandberg, J.D., and D.G. Goodman. 1974. Animal model of human disease. *American Journal of Pathology* 75:225 - 228.

- Stünzi, H. 1970. Sinn und Unsinn in der Krebsstatistik beim Hund. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 112:1420–1427.
- Stünzi, H. 1972. Gedanken zur Krebsstatistik bei Hund und Katze. *Kleintierpraxis* 17:66.
- Stünzi, H. 1973. Zur vergleichenden Pathologie des Lungenkarzinoms beim Haustier. *Pathologia et Microbiologia*:358-363.
- Stünzi, H., and G. Lott-Stolz. 1965. Gedanken zur Krebsstatistik beim Hund. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 20:793-795.
- Suter, M. 1977. Peri- und postnatale Todesursachen beim Hund. Inaugural-Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität, Zürich.
- Taylor, G. N., L. Shabestari, W. Angus, R. D. Lloyd, and C. W. Mays. 1979. Primary pulmonary tumors in beagles. *American Journal of Veterinary Research* 40:1316-8.
- Teske, E. 1994a. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Veterinary Quarterly* 16:209-219.
- Teske, E. 1994b. Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: an update. *Veterinary Quarterly* 16 Suppl 1:29s-31s.
- Teske, E., J. P. de Vos, H. F. Egberink, J. H. Vos, and J. P. De Vos. 1994. Clustering in canine malignant lymphoma. *Veterinary Quarterly* 16:134-136.
- Thacher, C., and R. L. Bradley. 1983. Vulvar and vaginal tumors in the dog: a retrospective study. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183:690-2.
- Thrusfield, M. 1988. Companion animal epidemiology: its contribution to human medicine. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplement* 84:57 - 65.
- Tjalma, R.A. 1966. Canine bone sarcoma: estimation of relative risks as a function of body size. *Journal of the National Cancer Institute* 36:1137-1150.
- Todoroff, R. J., and R. S. Brodey. 1979. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175:567-571.
- Überreiter, O. 1977. *Klinische Krebsforschung bei Tieren*. Edited by M. Lerche, A. Mayr, H. Spörri and E. G. White. Vol. 27, *Fortschritte der Veterinärmedizin*. Berlin: Paul Parey.
- Valli, V. E., B. J. McSherry, B. M. Dunham, R. M. Jacobs, and J. H. Lumsden. 1981. Histocytology of lymphoid tumors in the dog, cat and cow. *Veterinary Pathology* 18:494 - 512.
- Valli, V.E., A. Norris, R.M. Jacobs, E. Laing, S. Withrow, D. Macy, J. Tomlinson, D. McCaw, G.K. Ogilvie, G. Pidgeon, and R.A. Hendersons. 1995. Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. *Journal of Comparative Pathology* 113:113-130.

- Van der Gaag, I., R. P. Happe, and I. Van der Gaag. 1989a. Follow-up studies by large intestinal biopsies and necropsy in dogs with clinical signs of large bowel disease. *Canadian Journal of Veterinary Research* 53:473-476.
- Van der Gaag, I., R. P. Happe, and I. Van der Gaag. 1989b. Follow-up studies by peroral gastric biopsies and necropsy in vomiting dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 53:468-472.
- Van der Gaag, I., R. P. Happe, and I. Van der Gaag. 1990. The histological appearance of peroral small intestinal biopsies in clinically healthy dogs and dogs with chronic diarrhea. *Journal of Veterinary Medicine. Series A* 37:401-416.
- Van der Gaag, I., H. C. Walvoort, and I. Van der Gaag. 1983. Granular cell myoblastoma in the tongue of a dog: a case report. *Veterinary Quarterly* 5:89-93.
- Van Pelt, R.W., and G.H. Connor. 1968. Clinicopathological survey of malignant lymphoma in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 152:976-989.
- Vandeveld, M, R Fankhauser, and H Luginbühl. 1985. Immunocytochemical studies in canine neuroectodermal brain tumors. *Acta Neuropathologica (Berlin)* 66:111-116.
- Vandeveld, M, R Fatzer, and R Fankhauser. 1981. Immunohistological studies on primary reticulosis of the canine brain. *Veterinary Pathology*. 18:577 - 588.
- Vechten, M. van, M.H. Goldschmidt, J.A. Wortman, and M. Van Vechten. 1990. Embryonal rhabdomyosarcoma of the urinary bladder in dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 12:783 - 793.
- Veress, B., V. Gadaleanu, I. Nennesmo, and B.M. Wikstrom. 1993. The reliability of autopsy diagnostics: inter-observer variation between pathologists, a preliminary report. *Qual Assur Health Care* 5:333-337.
- von Bomhard, D., and J. Dreiack. 1977. Statistische Erhebung über Mammatumoren bei Hündinnen. *Kleintierpraxis* 22:205 - 209.
- von Dewitz, M. 1987. Zum Metastasierungsmuster einiger häufig auftretender maligner Geschwülste beim Hund. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- von Sandersleben, J., E. Schäffer, and J. Weisse. 1973. Erkrankungs- und Todesursachen des alternden Hundes aus der Sicht der Sektionsstatistik. *Kleintierpraxis* 18:25-26, 28, 30-32.
- Vos, J. H. 1988. Uterine and cervical carcinomas in five dogs. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 35:385-390.
- Vos, J. H., and I. van der Gaag. 1987. Canine and feline oral-pharyngeal tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 34:420-7.
- Wagstaff, D. J., L. S. Goyings, and R. F. Langham. 1967. Canine cancer distribution as related to data source. *American Journal of Veterinary Research* 28:1479-1482.
- Walter, J., and R. Ernst. 1990. Use and limit of an integrated software package (Lotus Symphony©) for documentation in pathology. Paper read at 8th European Congress of Veterinary Pathology, Sept 25., at Zürich+++Switzerland.

- Walter, J.H., and A. Kirchhoff. 1995. Erkrankungsursachen junger Hunde im Sektionsgut (1980-1993). *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 108:121-126.
- Weaver, A. D. 1976. Radiological diagnosis and prognosis of primary abdominal neoplasia in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 17:357-363.
- Weinstein, M. J., J. L. Carpenter, and C. J. M. Schunk. 1989. Nonangiogenic and non-lymphomatous sarcomas of the canine spleen: 57 cases (1975-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195:784-788.
- Weiss, E. 1974. VIII. Tumours of the soft (mesenchymal) tissues. *Bulletin of the World Health Organization* 50:101-110.
- Weiss, E. 1984. Die Metastasierung von Spontantumoren der Haustiere. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 68:67-76.
- Weiß, J. 1967. Übersicht über die wichtigsten Todes- und Erkrankungsursachen des Hundes im Zeitraum von 15 Jahren. Inaugural-Dissertation, Justus Liebig-Universität, Gießen.
- WHO. 1974. International histological classification of tumours of domestic animals (part 1). *Bulletin of the World Health Organization* 50:1-142.
- WHO. 1976. International histological classification of tumours of domestic animals (part 2). *Bulletin of the World Health Organization* 53:137-304.
- Wilcox, Bonnie, and Chris Walkowicz. 1993. *Hunderassen der Welt*. 3. ed. 2 vols. Mürtenbach/Eifel: Kynos Verlag.
- Willeberg, P., and W. A. Priester. 1982. Epidemiological aspects of clinical hyperadrenocorticism in dogs (canine Cushing's syndrome). *Journal of the American Animal Hospital Association* 18:717-724.
- Wilson, G. P., and H. M. Hayes, Jr. 1979. Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 174:1301-1303.
- Wilson, G. P., H. M. Hayes, Jr., and H. W. Casey. 1979. Canine urethral cancer. *Journal of the American Animal Hospital Association* 15:741-744.
- Wilson, R. B., M. A. Holscher, and P. S. Laney. 1991. Esophageal osteosarcoma in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 27:361-363.
- Yamagami, T., T. Kobayashi, K. Takahashi, and M. Sugiyama. 1996a. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice* 37:462-4.
- Yamagami, T., T. Kobayashi, K. Takahashi, and M. Sugiyama. 1996b. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *Journal of Veterinary Medical Science* 58:1079-1083.
- Zaninovic, P., and V. Simcic. 1994. Epidemiology of mammary tumours in dogs. *European Journal of Companion Animal Practice* 4:67-76.

4.2 Systemische, metastatische, eu- und heterotope Tumore des Herzens bei seziierten Hunden

*Die nachfolgende Untersuchung wurde bereits veröffentlicht. Es folgt das Reprint der unter dem Titel „Systemic, metastatic, eu- and heterope tumours of the heart in necropsied dogs“ im **Journal of Veterinary Medicine A**, 43: 31-45 (1996) erschienenen Arbeit.*

J. Vet. Med. A. 43, 31–45 (1996)
 © 1996 Blackwell Wissenschafts - Verlag, Berlin
 ISSN 0931–184X

Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin, Germany

Systemic, Metastatic, Eu- and Heterotope Tumours of the Heart in Necropsied Dogs

J. H. WALTER and R. RUDOLPH

Authors' address: Institut für Veterinär-Pathologie, Freie Universität Berlin, Strasse 518 Nr. 15, D-14163 Berlin, Germany

With 8 figures and 12 tables

(Received for publication June 10, 1995)

Summary

10 090 dissections of dogs exhibited 2631 neoplastic processes of which 309 involved the heart in the form of eu- and heteropic tumours. The most common primary and/or secondary heart tumour type was hemangiosarcoma ($n = 187$), followed by paraganglioma ($n = 46$), carcinoma ($n = 33$), malignant lymphoma ($n = 12$), thyroid heart base tumour ($n = 9$), melanoma ($n = 7$), mast cell tumour ($n = 3$) and blastoma ($n = 2$). The tumour diagnoses were immunohistochemically proved by various antibodies to cytokeratins, vimentin, GFAP, NSE, von Willebrand factor, CD3, CD45RA, S100, thyroglobulin as well as histochemically with argyrophilic, Fontana-Masson and heterochromatic reactions. The odds ratio (OR) for breed and tumour prevalences were determined: German shepherds showed the highest OR for hemangiosarcomas and boxers for paragangliomas.

Introduction

Heart tumours in dogs, as in humans (MCALLISTER, 1991; LAM et al., 1993), show a minimal prevalence (Table 1). Accordingly, the literature on this topic concentrates

Table 1. Cases selected from the literature of heart tumours in dogs

Author	No. tumour(s)/no. dissection case	Prevalence ratios (%)
LOPPNOW, 1961	34/2500	1.36
DETWEILER, 1962	18/314	5.73
LUGINBÜHL and DETWEILER, 1965	1/309	0.32
DETWEILER and PATTERSON, 1965	6/4831	0.12
PRIESTER and MCKAY, 1980	81/17 435	0.46
ESKENS, 1983	59/4416	1.34
CAMMARATA et al., 1987	38/4356	0.87
PRANGE et al., 1988	39/900	4.33
GUARDA et al., 1990	8/157	5.10

U.S. Copyright Clearance Center Code Statement: 0931 – 184X/96/4301 – 0031\$11.50/0

WALTER and RUDOLPH

primarily on individual tumour entities (LUDERER, 1973; BOMHARD et al., 1974; HAYES, 1975; PATNAIK et al., 1975; YATES et al., 1980; ARONSOHN, 1985; HAYES and SASS, 1988; WITTSTATT, 1988; KROTJE et al., 1990; COBB and BROWNLIE, 1992; SOUTHERLAND et al., 1993; SCHELLING and MOSES, 1994) or on the investigation of primary heart tumours (KLEINE et al., 1970; SANFORD et al., 1984).

In dogs, besides hemangiosarcomas (GEISEL et al., 1986), heart base tumours of the paraganglion aorticopulmonale (CAMMARATA et al., 1987) or resulting from ectopic thyroid glands (LEAV et al., 1976) seem to play a central role (PRIESTER and MCKAY, 1980).

The following study describes our experiences over a period of 14 years and presents the frequency and prevalence of cardiac neoplastic processes in post-mortem findings.

Material and Methods

The investigation is based on 10 090 dissections of dogs which were conducted at the Institute of Veterinary Pathology of the Free University of Berlin between 1 January 1980 and 1 January 1993. This work involved exclusively dogs from former West Berlin in order to achieve a rough overview of a more or less self-contained urban dog population. The investigation covered neoplastic processes of the pericardium, the heart and the large vascular blood vessels. The data for the individual animals was recorded in a dBase III® database and statistically evaluated with help of Epi-Info 5.0 as well as Microsoft Excel® software.

The available histological material was fixed in 4 % formalin, embedded in paraffin and stained with haematoxylin & eosin (H.E.). The samples were re-examined and partly reclassified. Argyrophilic reactions according to GRIMELIUS (1968) were additionally employed in the case of heart base tumours, Fontana-Masson reactions in the case of alleged melanoma and Unna reactions in the case of mast cell tumours. Furthermore, the neoplastic processes were immunohistochemically tested with the help of various antibodies (Table 2) using a modified alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) technique (CORDELL et al., 1984) in order to clarify the origin of the tissue. After removal of the paraffin, the slides were incubated with the primary antibody for 30 min, then treated for 30 min with bridge antibodies (1:100) and finally for 30 min with APAAP complex (1:100) added (all reaction agents: Dianova/Immunotech; Hamburg, Germany). The occurring reactions were made visible with Fast-Red, whereas naphthol-AS-MX-phosphate dissolved in N,N-dimethylformamide was employed as substrate. In the case of polyclonal antibodies a mouse-anti-rabbit antibody (1:200) was applied for 30 min before incubation with bridge antibodies. The stainings were conducted in the staining center Sequenza™ (Shandon; Frankfurt, Germany). In the case of a few antibodies (see Table 2) the slides were transferred to citrate buffer after the removal of the paraffin and treated twice for 5 min at 600 W in a microwave oven (Bosch, Germany); for the S100 staining the respective slides were treated beforehand with 0.1 % saponine (ICN, Germany) for 10 min.

The classification of the tumours took place to the greatest extent possible in accordance with WHO regulations (WHO, 1974; WHO, 1976) or according to the divisions of MOULTON (1990) with the exception: heart base tumours which were neuroendocrine in origin—the WHO classification prefers the term 'chemodectoma' inaugurated by MULLIGAN (1950)—were referred to as paraganglioma (WITTSTATT, 1988).

After descriptive statistical evaluation of the data an estimation of the risk factors such as breed and sex with the help of the evaluation from 2×2 contingency table (GART, 1970) was conducted. The initial root hypothesis—there is no connection between the individual 'risk factor' and the disease—was indirectly proven through the establishment of the 'odds ratio' as an estimation value for the relative risk (MANTEL and HAENSZEL, 1959; GART, 1970). The total population of all dissected dogs without neoplastic processes were drawn on as a makeshift reference population (WALTER and SCHWEGLER, 1992). The odds ratio (OR), also referred to as cross product (SACHS, 1992), is an estimation factor which describes the probability of whether dogs with a particular risk factor (for example breed) contract a certain disease more often in comparison to dogs without this characteristic. OR can take on any values ≥ 0 , whereas values > 1 point to a connection between the risk group and the disease. Whether or not a risk factor definitely contributed to the contraction of the disease was determined by the χ^2 test according to MANTEL and HAENSZEL (1959). The procedure also provides the 95 % confidence intervals (CI) for each value (MANTEL and HAENSZEL, 1959; GART, 1970). At the 0.05 level the initial

Heart Tumours in Necropsied Dogs

Table 2. Specifications of the antibodies applied for the immunohistochemistry

Antibody	Origin	Specificity	Dilution	Pretreatment	Source of reference
a-Chromogranin	polyclonal	Chromogranin A	1:300		Dako
a-Chromogranin	monoclonal	Chromogranin A	1:200		Dako
a-asm1	monoclonal	α -smooth muscle actin	1:100	Microwave	Progen
a-Thyreoglobulin	polyclonal	Thyreoglobulin	1:1200		Dako
a-v WF	polyclonal	von Willebrand Factor	1:300	Microwave	Dako
AE1	monoclonal	Type I-Cyokeratines	1:400	Microwave	ICI
AE3	monoclonal	Type II-Cyokeratines	1:100	Microwave	ICI
CD3	polyclonal	T-cells	1:100	Microwave	Dako
CD45RA	monoclonal	Lymphocytes	1:20	Microwave	Dr KRÄMMER; GSF, München
D33	monoclonal	Desmin	1:100	Microwave	Dako
NSE	monoclonal	Neuron-specific Enolase	1:500	Microwave	Dako
NSE	polyclonal	Neuron-specific Enolase	undiluted		Dianova
S100	polyclonal	S100-Protein	1:1200	Saponine	Dako
VIM3B4	monoclonal	Vimentin	1:30	Microwave	Progen
GFAP	polyclonal	GFAP	1:200		Dako

WALTER and RUDOLPH

Table 3. Frequency of tumours and cardiac neoplastic processes in necropsied dogs (n = 10 090) and sex distribution of dogs with heart tumours (n = 309)

	n	Prevalence ratios (%)	Male, entire	Male, neuterized	Female, entire	Female, neuterized
Number of tumour necropsied cases	2631	26.08	1278	68	1142	125
Number of cases with cardiac tumours	309	3.06	187	7	102	11

Table 4. Age distribution of dogs with neoplastic processes of the heart (mean of age: 10.16 ± 2.46 years. [n = 305]; age range 1–17 years)

Age (years)	n	Prevalence ratios (%)
≤ 1	0	0.00
> 1–3	3	0.98
> 3–6	14	4.59
> 6–9	99	32.46
> 9–13	161	52.79
> 13–17	28	9.18
unknown	4	

Table 5. Risk analyses of the breeds most often afflicted with heart tumours (95 % confidence limit)

Breed	No. of heart tumours	Prevalence ratios	Odds ratio	χ^2	Confidence Interval (lower to upper)
Boxer	41	13.27	6.152	125.49	4.477–8.454
German Shepherd	90	29.13	2.357	46.362	1.842–3.017
Mixed breed	71	22.98	1.29	3.389	0.984–1.692
Cocker	18	5.83	1.169	0.394	0.718–1.904
Poodle	20	6.47	0.863	0.390	0.543–1.37
Terrier	15	4.85	0.392	13.214	0.65–0.237
Dachshund	12	3.88	0.332	15.228	0.578–0.191

root hypothesis was rejected, if $\chi^2_{MH} > \chi^2_{1,0.05}$ (SACHS, 1992). This means, when χ^2_{MH} was greater than the critical value of 3.841 (SACHS, 1992), a risk factor was recognized.

Results

A total of 26.08 % of the 10 090 dissected dogs exhibited neoplastic processes. In 309 cases, in other words, in 3.06 % of all dissections or 11.74 % of all cases of neoplastic processes, the heart was involved, whereas male dogs were more likely to be afflicted (Table 3); the mean age of these animals was 10.16 years (Table 4). Table 5 indicates the breed distribution. German shepherds, bastards and boxers were most commonly represented. The odds ratio and therefore the risk of cardiac neoplastic processes was highest among boxers and German shepherds. As indicated in Table 6, many more than half of the cases of cardiac neoplastic processes were sarcomas. On the other hand, in the case of sarcomas of the heart, haemangiosarcomas (malignant

Heart Tumours in Necropsied Dogs

Table 6. Frequency of cardiac tumour types

Tumour type	n	%
Sarcoma (including haemangiosarcoma)	197	63.75
Haemangiosarcoma	187	60.52
Paraganglioma	46	14.89
Carcinome	33	10.68
Malignant Lymphoma	12	3.88
Thyrogenic heart base tumour	9	2.91
Melanoma	7	2.27
Mast cell tumour	3	0.97
Blastoma	2	0.65
Total	309	100

Table 7. Risk analysis of breed predilection of dogs with haemangiosarcomas of the heart (multiple occurrence)

Breed	Multiple haemangiosarcomas	Prevalence ratios	Odds ratio	χ^2	Confidence Interval
German Shepherd	69	42.86	4.221	91.888	3.144–5.666
Mixed breed	39	24.22	1.351	2.623	0.939–1.944
Boxer	12	7.45	2.789	12.064	1.563–4.975
Poodle	9	5.59	0.724	0.877	0.368–1.423
Cocker	6	3.73	0.709	0.681	0.313–1.605
Dachshund	6	3.73	0.316	8.489	0.146–0.686
Terrier	5	3.11	0.243	11.320	0.107–0.554
Others	15	9.32	n.d.	n.d.	n.d.
Total	161	100			

n.d. = not determined.

Table 8. Risk analysis of breed predilection of dogs with solitary/primary haemangiosarcomas of the heart

Breed	Solitary haemangiosarcomas	Prevalence ratios	OR	χ^2	Confidence Interval
German Shepherd	13	50.00	2.111	5.397	1.124–3.965
Boxer	3	11.54	2.316	2.070	0.738–7.271
Mixed breed	3	11.54	0.871	0.126	0.406–1.867
Cocker	2	7.69	0.824	0.072	0.2–3.389
Terrier	2	7.69	0.344	2.39	0.089–1.331
Others	3	11.54	n.d.	n.d.	n.d.
Total	26	100			

haemangioendotheliomas), which constituted a total of 60.52 % (n = 187) of all heart tumours, were the most prevalent. Of these haemangiosarcomas, 161 occurred multicentrically (Table 7), 26 exclusively in the heart (Table 8; Fig. 1). In all cases tumour cells could be marked with von Willebrand factor (Fig. 2). Carcinomas of the heart could be observed among 10.68 % of those dogs with heart tumours which exhibited cytokeratins; 75 % of these carcinomas were metastases of adenocarcinomas of the

WALTER and RUDOLPH



Fig. 1. Left heart chamber; dog. Haemangiosarcoma which has bulged out into the lumen (arrow).

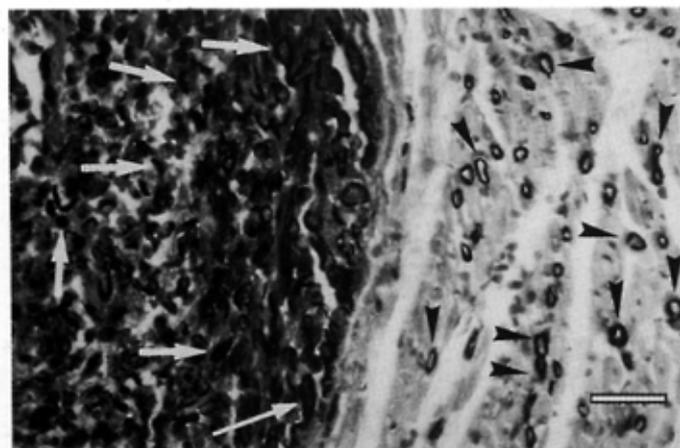


Fig. 2. Haemangiosarcoma of the myocardium; dog. Representation of the normal (small arrows) and neoplastic (arrowhead) endothelium with von Willebrand factor. APAAP method, haematoxylin counterstain. Bar = 50 μ m.

mammary gland (Table 9). Malignant lymphomas (lymphosarcomas) could be observed in the hearts of 12 animals (= 3.88 %) (Fig. 3). Through elimination diagnosis all of them could be diagnosed as b-cell lymphomas: the lymphocyte marker CD45RA, which recognizes b-cells and subsets of the t-cell-series, marked all of the lymphoma cells, while the t-cell marker CD3 only stained individual cells, probably reactive t-cells (Table 10). With the help of immunohistochemistry the tissue of origin could be identified in the case of 10 of the 12 tumours originally diagnosed as 'blastomas' (8 sarcomas, 1 haemangiosarcoma, 1 carcinoma of unknown origin); in the case of two neoplastic processes the origin could not be verified.

73.78 % of all heart tumours appeared within the framework of a systematic or metastatic tumour occurrence. In a total of 81 (= 26.22 %) cases eutopic heart tumours could be observed. In 46 cases (14.89 %) paragangliomas (Fig. 4), in 26 cases (9.29 %)

Heart Tumours in Necropsied Dogs

Table 9. Origin of carcinomatous heart tumours

	Tissue of origin	n	Cardiac carcinomas (%)	Heart tumours (%)
Carcinomas	Total	33	100	10.68
	Mammary glands	22	66.67	7.12
	Lungs	4	12.12	1.29
	Pancreas	2	6.06	0.65
	Adrenal gland	2	6.06	0.65
	Thyroid gland	1	3.03	0.32
	Anal sac gland	1	3.03	0.32
	Questionable origin	1	3.03	0.32

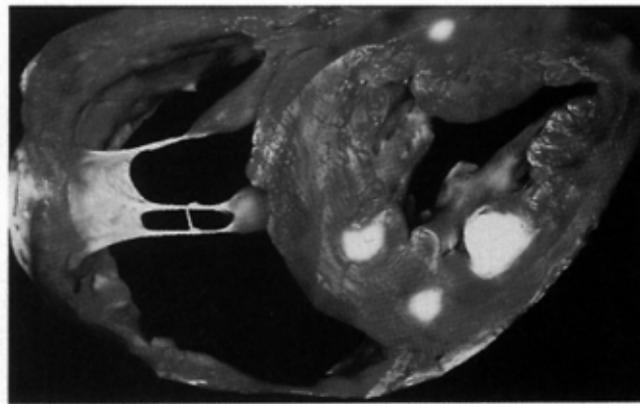


Fig. 3. Heart; dog. Malignant lymphoma of the myocard.

singular haemangiosarcomas of the right ventricle of the heart and in 9 cases (2.91 %) ectopic thyroid heart base tumours were observed in the process (Tables 6–9). Neoplastic processes of the myocardium could not be determined. The immune reactivity of the tumours is presented in Table 10. In the case of paragangliomas (Fig. 4), Grimelius staining (Fig. 5) proved to be more sensitive than the chromogranin staining. While the monoclonal antibody to chromogranin A did not stain, only half of the paragangliomas tumour cells were stained with the polyclonal antibody to chromogranin A (Fig. 6). Furthermore, neuron-specific enolase (NSE) could be immunohistochemically presented in the main cells (parenchyme cells) of the paragangliomas with a polyclonal antibody and sustentacular cells in a portion of the paragangliomas with evidence of GFAP (Fig. 7) and S100 protein. The monoclonal antibody did not react to NSE.

Nine heart tumours could be identified by way of immunohistochemical throglobulin staining (Fig. 8) as thyrogenic heart base tumours.

All five melanomas could already be recognized with H.E. staining as melanomas of the spindle cell type, in two questionable cases the Fontana reaction proved to be more sufficient than S100 protein staining.

Three of the mast cell tumours which had infiltrated the myocard reacted with clear heterochromasia.

On the whole, it became evident that boxers clearly exhibit an extremely high tendency to paragangliomas (Table 11), German shepherds to solitary haemangiosarcomas of the heart (Table 8) and terriers to thyrogenic heart base tumours (Table 12).

WALTER and RUDOLPH

Table 10. Immunohistochemical and histochemical reactivity of heart tumours

Tumour	Antibody	Total stained	Results ^a
Haemangiosarcomas	von Willebrand Factor	187	68+++ , 95+++ , 15+
	AE1/AE3	187	187-
Paragangliomas ^b	Chromogranin A, monoclonal (type I-cells)	46	46-
	Chromogranin A, polyclonal (type I-cells)	46	1+, 23+, 8±, 14-
	S100 (type II-cells)	46	8+, 18(+), 4±, 16-
	GFAP (type II-cells)	46	2+, 5+, 23(+), 2±, 14-
	Grimelius-staining	46	30+++ , 13+++ , 3+
	AE1/AE3	46	46-
	NSE, monoclonal (type I-cells)	46	46-
Melanomas	NSE, polyclonal (type I-cells)	46	32+++ , 5+++ , 7+, 2±
	S100	7	1+++ , 2(+), 4-
	Vimentin	7	2+++ , 5±
	Fontana	7	5+++ , 2+
Carcinomas	AE1	33	28+++ , 5-
	AE3	33	3+++ , 10+++ , 19(+), 1-
	CD3	12	12(+)
Lymphomas	CD45RA	12	8+++ , 4++
	Vimentin	12	9+++ , 2++ , 1-
Ectopic thyroid	Thyroglobulin	9	8+++ , 1+
Heart base tumours	AE1/AE3	9	9+++
	Vimentin	9	only mesenchymal areas stained

^a +++ = ≥ 75 % stained; ++ = 50 % stained; + = ≤ 25 % stained; (±) = only individual cells stained; ± = heterogeneous staining; - = negative.

^b type I-cells = chief cells; type II-cells = sustentacular cells.

Heart Tumours in Necropsied Dogs

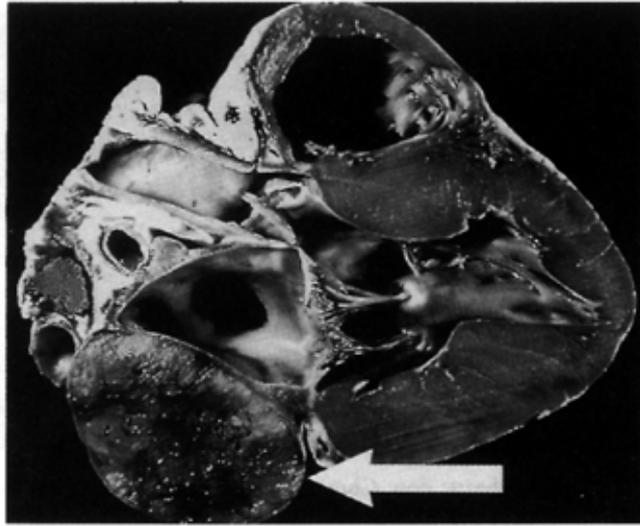


Fig. 4. Heart; dog. Paraganglioma of the heart base (arrow).

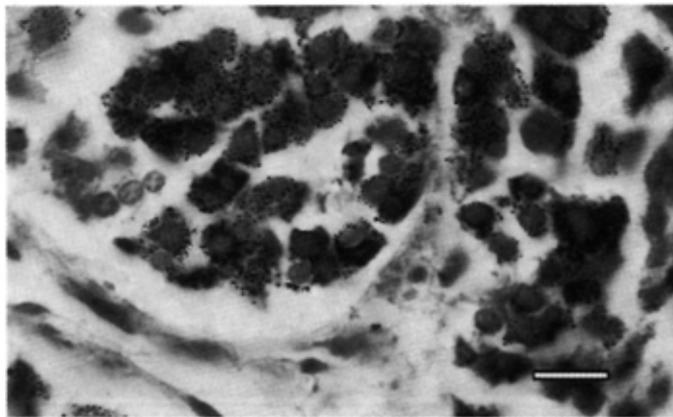


Fig. 5. Paraganglioma of the heart; dog. Representation of neuroendocrine granula in the main cells. Grimelius-silver staining, nuclear Fast Red counterstain. Bar = 15 μ m.

Discussion

This investigation shows that neoplastic processes of the heart, especially in older dogs, can be observed in the form of sarcomas, paragangliomas, carcinoma metastases, lymphomas and thyrogenic heart base tumours. Compared with other investigations (Table 1), the prevalence of 3.06 % which we documented is of middle standing. Here metastases and systemically (multicentrically) distinguished neoplastic processes (haemangiosarcomas, lymphomas) are considerably more frequent than primary heart tumours. Within a multicentric growth, haemangiosarcomas in particular but also carcinoma metastases, malignant lymphomas, melanomas and mast cell tumours can be found. 86.09 % of the haemangiosarcomas occurred multicentrically and did not only affect the heart. Similar results have been reported by other investigators,

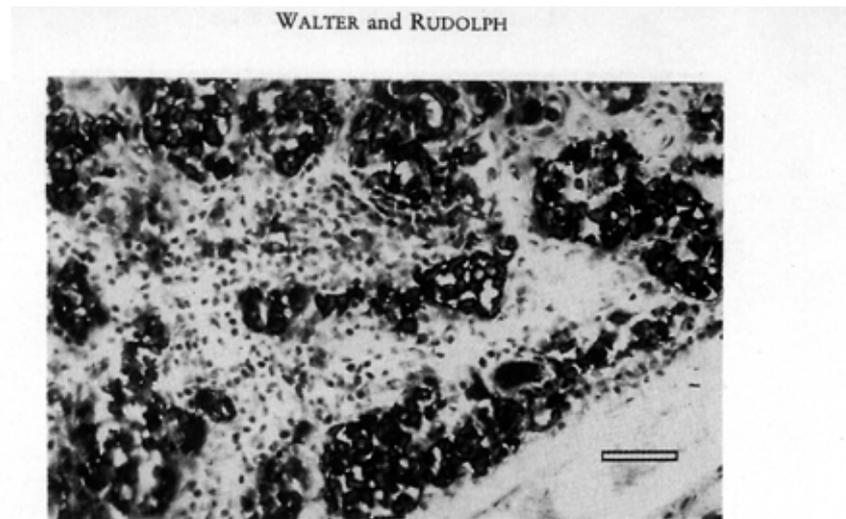


Fig. 6. Paranglioma of the heart; dog. Chromogranin evidence in the main cells. APAAP method, haematoxylin counterstain. Bar = 50 μ m.

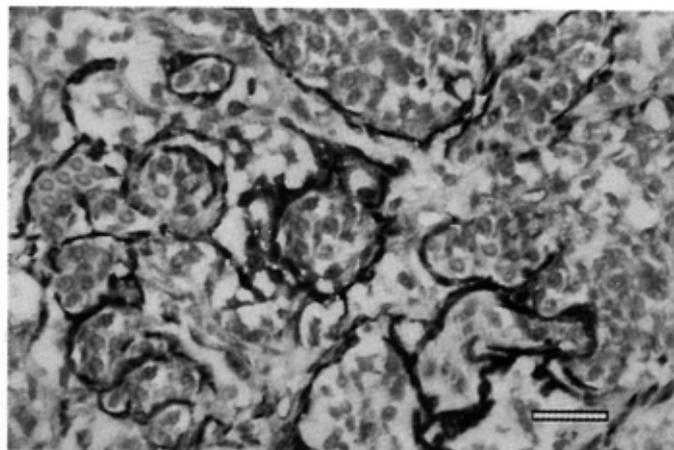


Fig. 7. Paranglioma of the heart; dog. GFAP positive sustentacular cells surrounding the main cells. APAAP method, haematoxylin counterstain. Bar = 40 μ m.

whereas haemangiosarcomas account all in all for the most commonly occurring malignant neoplastic processes in dogs with particular emphasis on German shepherds (PRIESTER and MCKAY, 1980; ESKENS, 1983; BROWN et al., 1985; GEISEL et al., 1986). Malignant lymphomas of the heart could be diagnosed in the case of 12 dogs. Although these can be observed more frequently in the case of humans (LAM et al., 1993), corresponding cases among dogs are comparatively rare (KOCH et al., 1994). The lack of immunohistochemical investigation confirms that even with regard to the heart, b-cell lymphomas are the most frequent immunophenotypical lymphoma diseases in dogs (TESKE, 1993). In correspondence with the frequency of canine mammary tumours (WALTER and SCHWEGLER, 1992), most of the carcinoma metastases which we observed were from the mammary gland. The frequencies of melanomas and mast cell tumours correspond to the average frequency of this kind in all post-mortem findings (WALTER and SCHWEGLER, 1992).

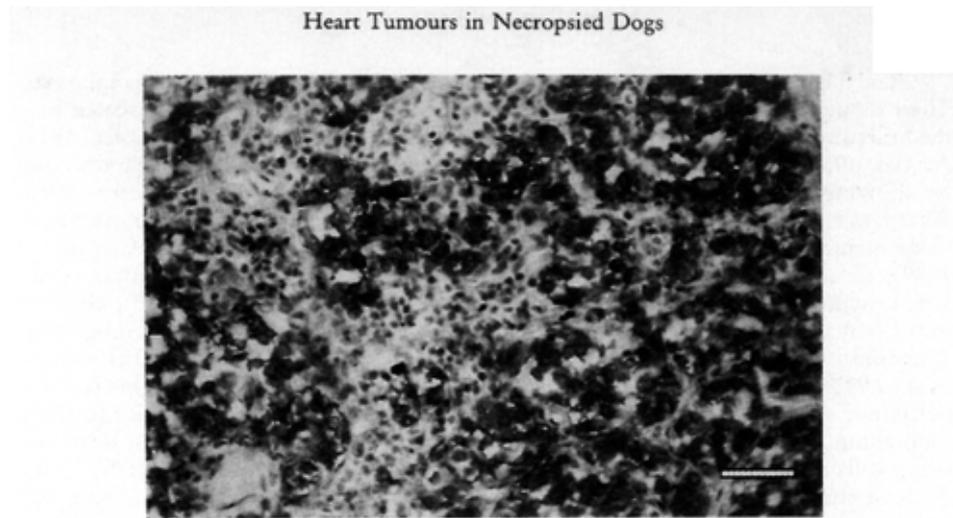


Fig. 8. Myocard; dog. Ectopic thyroid gland tissue with microfollicular to solid appearance penetrating the area of the right heart base. Proven by thyroglobulin. APAAP-method, haematoxylin counterstain. Bar = 40 μ m.

Table 11. Frequency of breed with regard to paragangliomas of the heart

Breed	No. of paragangliomas	Prevalence ratios	OR	χ^2	CI
Boxer	22	47.83	33.341	325.120	22.773–48.812
Mixed breed	8	17.39	0.871	0.126	0.406–1.867
Poodle	4	8.7	1.155	0.075	0.412–3.239
German Shepherd	4	8.7	0.506	1.749	0.184–1.389
Beagle	2	4.35	3.214	2.862	0.831–12.431
Dachshund	2	4.35	0.369	2.059	0.095–1.44
Basset Hound	1	2.17	n.d.	n.d.	n.d.
Cocker Spaniel	1	2.17	n.d.	n.d.	n.d.
Mastino Napol.	1	2.17	n.d.	n.d.	n.d.
Yorkshire Terr.	1	2.17	n.d.	n.d.	n.d.
Total	46	100			

n.d. = not determined.

Table 12. Frequency of breed with regard to thyrogenic heart base tumours

Breed	No. of ectopic thyroid tumours	Prevalence ratios	OR	χ^2	CI
Mixed breed	3	33.33	2.06	1.089	0.53 – 8.005
Terrier	2	22.22	2.16	0.967	0.465–10.025
German Shepherd	1	11.11	n.d.	n.d.	n.d.
Hovawart	1	11.11	n.d.	n.d.	n.d.
Dachshund	1	11.11	n.d.	n.d.	n.d.
Miniature Pinscher	1	11.11	n.d.	n.d.	n.d.
Total	9	100			

n.d. = not determined.

WALTER and RUDOLPH

The most common eutope heart tumours in this investigation are paragangliomas. Their tissue of origin is the paraganglion aorticopulmonale (LACK, 1994) located near the heart and, like all paraganglia, consists of main and sustentacular cells (KOCK, 1951; ADAMS, 1958). Paraganglia and their neoplastic processes can be clearly characterized by showing argyrophilic neuroendocrine granula (GRIMELIUS and WILANDER, 1985; WITTSTATT, 1988) in the main cells. Additionally, there is a series of immunohistochemical markers for neuroendocrine differentiation (KLIEWER and COCHRAN, 1989). In addition to neuron-specific enolase (NSE) in the main cells (HINES et al., 1993), which in spite of its name is not neuron-specific (SCHMECHEL, 1985), effective proof is made possible by antibodies in reaction to chromogranine. Chromogranine A should be responsible for the argyrophilic reaction of endocrine cells (LUNDQUIST et al., 1990), there are, however, numerous indications for the heterogeneous staining behaviour of these cells. Positive argyrophilia and positive immunoreactivity to chromogranine A are sometimes shown in the endocrine cells of various species, however, many cells react exclusively argyrophilic or only to chromogranine A (CETIN, 1992). At least for dogs this can be substantiated by the present investigation (Table 10): polyclonal antibodies for chromogranine A are not able to verify paragangliomas because of their heterogeneous staining behaviour in contrast to Grimelius reaction. As HINES et al. (1993) noted, monoclonal antibodies do not react to chromogranine A in canine paraganglia. The numerically low portion of S-100 and GFAP positive sustentacular cells is related to their low portion in canine paragangliomas (WITTSTATT, 1988), whereas paragangliomas even among humans show little or even no sustentacular cells (KLIEWER and COCHRAN, 1989; LACK, 1994). A breed predisposition for paragangliomas can be assumed on the basis of the clearly high OR values for boxers (Table 11). As chronic hypoxia resulting from long-lasting stays at high altitudes accompany hyperplasia of the paraganglia (EDWARDS et al., 1971), a breed-related chronic hypoxia among chondrodystrophic breeds (HAYES, 1975) is probably responsible for the development of paragangliomas. It is true that boxers are obviously over-represented in our investigation for paragangliomas, nevertheless boxers in general clearly exhibit a high prevalence of neoplastic processes (WALTER and SCHWEGLER, 1992). Other chondrodystrophic breeds are not represented among the cases in our investigation.

Primary haemangiosarcomas in our study are the second most common cause of eutope heart tumours. The clarification of the question as to whether a haemangiosarcoma of the heart is primary or metastatic is not definitely verifiable in each individual case of multiplicity. As a result this study only refers to primary or eutope tumours, when the heart is involved. All other cases will be perceived as systemic-multicentric occurrences. The diagnosis of haemangiosarcoma could be confirmed in all cases through proof of the von Willebrand factor (BEUST et al., 1988), a component of the factor VIII glycoprotein complex. The statistically significant over-representation of the German shepherd regarding haemangiosarcomas is generally known (PRIESTER and MCKAY, 1980; BROWN et al., 1985; SREBERNIK and APPLEBY, 1991).

With nine proven thyrogenic heterotope heart base tumours, the origin of which may have been embryonic dispersal of thyroid gland tissue, these tumour entities are very rarely represented in our investigation findings. Thyrogenic heart base tumours are a great rarity not only among dogs (THAKE et al., 1971; BOMHARD et al., 1974; WITTSTATT, 1988), but also among humans (LAM et al., 1993). The calculated higher OR for terriers shows no tendencies due to their low incidence in the investigation material.

The most common primary tumours among humans, rhabdomyoma of the myocardium or myxoma of the heart valves (MCALLISTER, 1991; LAM et al., 1993), were not observed by us. In correspondence with other investigators these tumour entities do not seem to play a role in the case of dogs; only ORI et al. (1994) report a case of myxoma of the heart and CAMMARATA et al. (1987) as well as KROTJE et al. (1990) each reports a case of rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma of the myocardium among dogs.

Heart Tumours in Necropsied Dogs

Although heart tumours in dogs is one of the areas of veterinary medicine receiving the least attention, the rate of incidence of 3.06 % in the post-mortem findings nevertheless qualifies the need, on the part of the clinic, for example in the case of unusual ECG findings (BAATZ et al., 1992) or pericardiac contusions of unclear recovery (BERG and WINGFIELD, 1984), for the possibility of considering cardiac neoplastic processes. More recent investigation techniques make possible early diagnosis (KEENE et al., 1990; SMITH et al., 1992); above all reports of surgical treatment are available (BROWNLIE and JONES, 1985; WYKES et al., 1986; BREZNOCK, 1988; BERG, 1990).

Acknowledgements

This investigation was partially supported by the Akademie für Tiergesundheit (Bonn). Ms SUSANNE HAHN's excellent assistance in immunohistochemistry was greatly appreciated. Ms Dr KRÄMMER, GSF München, provided access to antibodies for canines CD45RA.

References

- ADAMS, W. E., 1958: The comparative morphology of the carotid body and carotid sinus. Charles C. Thomas, Springfield.
- ARONSOHN, M., 1985: Cardiac hemangiosarcoma in the dog: a review of 38 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **187**, 922-926.
- BAATZ, G., J. WALTER, K. GERLACH, I. MIDDEL-ERDMANN, and E. TRAUTVETTER, 1992: Geschwulstbedingte Arrhythmie beim Hund. *Prakt. Tierarzt* **73**, 625-629.
- BERG, J. R., and W. WINGFIELD, 1984: Pericardial effusion in the dog: a review of 42 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **20**, 721-730.
- BERG, R., 1990: Surgical treatment of pericardial diseases. In: BOJRAB, M. J. (ed.) *Current techniques in small animal surgery*, 3rd ed., pp. 522-529. Lea and Febiger, Philadelphia.
- BEUST, B. v., M. SUTER, B. SUMMERS, and B. VON BEUST, 1988: Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* **25**, 251-255.
- BOMHARD, D. v., M. LUDERER, T. HÄNICHEN, and J. v. SANDERSLEBEN, 1974: Zur Histogenese der Herzbasisumoren beim Hund. Eine histologische, histochemische und elektronenmikroskopische Studie. *Zentralbl. Veterinärmed. [A]* **21**, 208-224.
- BREZNOCK, E., 1988: Thoracic thymomas and heart base tumors: surgical vs nonsurgical treatment. *Vet. Surg.* **17**, 30.
- BROWN, N., A. PATNAIK, and E. MACEWEN, 1985: Canine hemangiosarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **186**, 56-58.
- BROWNLIE, S. E., and D. G. C. JONES, 1985: Successful removal of a heart base-tumour in a dog with pericardial haemorrhagic effusion. *J. Small Anim. Pract.* **26**, 191-197.
- CAMMARATA, G., M. CARAMELLI, S. CAVAZZINI, E. CORNALIGIA, and E. VITALI, 1987: Neoplasie cardiache e della base del cuore nel cane: Contributo casistico e studio istologico [Neoplasms of the heart and heart base in dogs: incidence and histopathology]. *Clinica Veterinaria* **110**(2), 97-110.
- CETIN, Y., 1992: Chromogranin A immunoreactivity and Grimelius' argyrophilia. A correlative study in mammalian endocrine cells. *Anat. Embryol.* **185**, 207-215.
- COBB, M., and S. BROWNLIE, 1992: Intrapericardial neoplasia in 14 dogs. *J. Small Anim. Pract.* **33**, 309-316.
- CORDELL, J. L., B. FALINI, W. N. ERBER, A. K. GHOSH, Z. ABDULAZIZ, S. MACDONALD, K. A. F. PULFORD, H. STEIN, and D. Y. MASON, 1984: Immunoencymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* **32**, 219-229.
- DETWEILER, D. K., 1962: Wesen und Häufigkeit von Herzkrankheiten bei Hunden. *Zentralbl. Veterinärmed. [A]* **9**, 317-357.
- DETWEILER, D. K., and D. F. PATTERSON, 1965: The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **127**, 481-516.
- EDWARDS, C., D. HEATH, P. HARRIS, C. Y. H. KRUGER, and J. ARIAS-STELLA, 1971: The carotid body in animals at high altitude. *J. Pathol.* **104**, 231-238.
- ESKENS, U., 1983: Statistische Untersuchungen nach den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifizierte Geschwülste des Hundes unter besonderer

WALTER and RUDOLPH

- Berücksichtigung der Mamma- und Hauttumoren. Justus-Liebig-Universität, Gießen, Inauguraldissertation.
- GART, J. J., 1970: Point and interval estimation of the common odds ratio in the combination of 2×2 tables with fixed margins. *Biometrika* 57, 471–475.
- GEISEL, O., S. KUSCH, and H. KLEIN, 1986: Vorkommen, Primärsitz und Metastasierungsmuster des Hämangioendothelioms beim Hund. *Tierärztl. Praxis* 14, 389–395.
- GRIMELIUS, L., 1968: The argyrophil reaction in islet cells of adult human pancreas studied with a new silver nitrate procedure. *Acta Soc Med Upsal* 73, 271–294.
- GRIMELIUS, L., and E. WILANDER, 1985: Silver impregnation and other non-immunocytochemical staining methods. In: POLAK, J. M., and S. R. BLOOM (eds.), *Endocrine tumours*, pp. 95–115. The pathology of regulatory peptide producing tumors. Churchill Livingstone, New York.
- GUARDA, F., C. BUSSADORI, C. SCOTTI, B. BIANCO, and C. VERCELLI, 1990: Sulla patologia cardiaca nel cane: studio su 157 casi. *Veterinaria (Cremona)* 4, 13–19.
- HAYES, H. M., 1975: An hypothesis for the aetiology of canine chemoreceptor system neoplasms, based upon an epidemiological study of 73 cases among hospital patients. *J Small Anim. Pract.* 16, 337–343.
- HAYES, H. M., and B. SASS, 1988: Chemoreceptor neoplasia: a study of the epidemiological features of 357 canine cases. *J. Vet. Med. Ser. A* 35, 401–408.
- HINES, M., J. NEWTON, N. ALTMAN, T. HRIBERNIK, and H. CASEY, 1993: Metastasizing extra-adrenal paraganglioma with neurological signs in four dogs. *J. Comp. Pathol.* 108, 283–290.
- KEENE, B., J. RUSH, A. COOLEY, and R. SUBRAMANIAN, 1990: Primary left ventricular hemangiosarcoma diagnosed by endomyocardial biopsy in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 1501–1503.
- KLEINE, L. J., B. C. ZOOK, and T. O. MUNSON, 1970: Primary cardiac hemangiosarcomas in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157, 326–337.
- KLIEWER, K. E., and A. J. COCHRAN, 1989: A review of the histology, ultrastructure, immunohistochemistry, and molecular biology of extra-adrenal paragangliomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 113, 1209–1218.
- KOCH, J., A. JENSEN, H. PEDERSEN, and P. LEIFSSON, 1994: Specific heart muscle disease secondary to lymphosarcoma in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 35, 28–31.
- KOCK, L. L. D., 1951: Histology of the carotid body. *Nature* 167, 611–612.
- KROTJE, L. J., W. A. WARE, and Y. NIYO, 1990: Intracardiac rhabdomyosarcoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 368–371.
- LACK, E. E., 1994: *Pathology of adrenal and extra-adrenal paraganglia*, 1st ed. Major problems in pathology. W. B. Saunders, Philadelphia.
- LAM, K., P. DICKENS, and A. CHAN, 1993: Tumors of the heart. A 20-year experience with a review of 12485 consecutive autopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117, 1027–1031.
- LEAV, I., A. L. SCHILLER, A. RIJNBERK, M. A. LEGG, and P. J. DER KINDEREN, 1976: Adenomas and carcinomas of the canine and feline thyroid. *Am. J. Pathol.* 83, 61–122.
- LOPPNOW, H., 1961: Zur Kasuistik primärer Herztumoren beim Hund (zwei Fälle von Hämangiom am rechten Herzohr). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 74, 214–217.
- LUDERER, M., 1973: Zur Histogenese der Herzbasistumoren des Hundes. Eine lichtmikroskopische und histochemische Studie. Ludwig Maximilian Universität München, Vet. med. Diss., Thesis.
- LUGINBÜHL, H., and D. K. DETWEILER, 1965: Cardiovascular lesions in the dog. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 127, 517–540.
- LUNDQUIST, M., H. ARNBERG, J. CANDELL, M. MALMGREN, E. WILANDER, L. GRIMELIUS, and K. ÖBERG, 1990: Silver stains for identification of neuroendocrine cells. A study of the chemical background. *Histochem. J.* 22, 615–623.
- MANTEL, N., and W. HAENSZEL, 1959: Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 22, 719–748.
- MCALLISTER, H. A. J., 1991: Tumours of the heart and pericardium. In: SILVER, M. D. (ed.) *Cardiovascular Pathology*, 2nd ed. pp. 1297–1333. Churchill Livingstone, New York.
- MOULTON, J. E., 1990: *Tumors of domestic animals*, 3rd ed. University of California Press, Berkeley.
- MULLIGAN, R. M., 1950: Chemodectoma in the dog. *Am. J. Pathol.* 26, 680–681.
- ORI, J., T. YAMAGUCHI, Y. SASA, M. KOMIYA, and I. NARAMA, 1994: A case of canine cardiac myxoma. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* 47, 499–501.

Heart Tumours in Necropsied Dogs

- PATNAIK, A. K., S.-K. LIU, A. I. HURVITZ, and A. J. MCCLELLAND, 1975: Canine chemodectoma (extra-adrenal paragangliomas)—a comparative study. *J. Small Anim. Pract.* **16**, 785–801.
- PRANGE, H., G. FALK-JUNGE, D. KATENKAMP, E. SCHNEIDER, and M. ZIEGER, 1988: Zur Verbreitung, Epizootiologie und Röntgendiagnostik intrathorakaler Geschwülste beim Hund. *Arch. Exper. Vet. Med.* **42**, 637–649.
- PRIESTER, W. A., and F. W. MCKAY, 1980: The occurrence of tumors in domestic animals. National Cancer Institute Monograph 54. National Institutes of Health, Bethesda.
- SACHS, L., 1992: *Angewandte Statistik*. 7. Ed., Springer-Verlag, Berlin.
- SANFORD, S. E., D. M. HOOVER, and R. B. MILLER, 1984: Primary cardiac granular cell tumor in a dog. *Vet. Pathol.* **21**, 489–494.
- SHELLING, S., and B. MOSES, 1994: Primary intracardiac osteosarcoma in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**, 396–398.
- SCHMECHEL, D., 1985: γ -Subunit of the glycolytic enzyme enolase: Nonspecific or neuron-specific. *Lab. Invest.* **52**, 239–242.
- SMITH, K., L. MILLER, and D. BILLER, 1992: Detection of right atrial hemangiosarcoma using nonselective angiocardigraphy in a dog. *Can. Vet. J.* **33**, 673–675.
- SOUTHERLAND, E., R. MILLER, and C. JONES, 1993: Primary right atrial chondrosarcoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **203**, 1697–1701.
- SREBERNIK, N., and E. APPLEBY, 1991: Breed prevalence and sites of haemangioma and haemangiosarcoma in dogs. *Vet. Rec.* **129**, 408–409.
- TESKE, E., 1993: Non-Hodgkin's lymphoma in the dog: characterization and experimental therapy. Universiteit Utrecht, Vet. med. Diss., Thesis.
- THAKE, D., N. CHEVILLE, and R. SHARP, 1971: Ectopic thyroid adenomas at the base of the heart of the dog: Ultrastructural identification of dense tubular structures in endoplasmatic reticulum. *Vet. Pathol.* **8**, 421–432.
- WALTER, J. H., and K. SCHWEGLER, 1992: Untersuchungen zur Häufigkeit von Neoplasien bei seziierten Hunden in Berlin (West). *J. Vet. Med. Ser. A* **39**, 328–341.
- WHO, 1974: International histological classification of tumours of domestic animals (part 1). *Bull. Wld. Hlth. Org.* **50**(1–2), 1–142.
- WHO, 1976: International histological classification of tumours of domestic animals (part 2). *Bull. Wld. Hlth. Org.* **53**(2–3), 145–304.
- WITTSTATT, U., 1988: Beitrag zur Differenzierung der Herzbasistumoren des Hundes mit Hilfe des immunhistochemischen Thyreoglobulin- und Calcitoninnachweises und der Silbernitratfärbung nach Grimelius. Freie Universität Berlin, Vet. med. Diss., Thesis.
- WYKES, P. M., G. P. ROUSE, and E. C. ORTON, 1986: Removal of five canine cardiac tumors using a stapling instrument. *Vet. Surg.* **15**, 103–106.
- YATES, W. D. G., S. J. LESTER, and J. H. L. MILLS, 1980: Chemoreceptor tumors diagnosed at the Western College of Veterinary Medicine 1967–1979. *Can. Vet. J.* **21**, 124–129.

4.3 Epidermis und Hauttumore

Das Unterkapitel 4.3 besteht aus drei in sich abgeschlossenen Arbeiten, die sich mit der Zytokeratinzusammensetzung der orthologischen Epidermis, mit dem Zytokeratinbesatz von Hauttumoren und mit dem Nachweis von Papillomavirus - antigen in Hauttumoren beschäftigen.

4.3.1 Zytokeratine in der Epidermis des Hundes

Zytokeratin-Polymorphismus und regulärer Nachweis von CK 6 in normaler Epidermis

Einleitung

Zytokeratine (CK) sind Bestandteile des Intermediärfilamentnetzes epithelialer Zellen und können bis zu 85 % des Gesamteiweißbestandes von Keratinozyten ausmachen (Fuchs 1995). Beim Menschen sind zur Zeit 20 verschiedene Zytokeratine (ohne Haarkeratine) bekannt (Moll 1993), die eine bemerkenswert epithelgewebespezifische Exprimierung aufweisen (Moll et al. 1982). Obwohl bereits in vielen Untersuchungen immunhistochemisch Zytokeratine in caninen Hautproben (meist Neoplasien) dargestellt wurden (Andreasen, Mahaffey, and Duncan 1988; Cardona et al. 1989; Ferrer et al. 1990; Rabanal et al. 1989), fehlen grundlegende Untersuchungen zur Zytokeratinzusammensetzung der caninen Haut. Bei der Epidermis des Menschen konnte gezeigt werden, daß der Moll'sche Zytokeratin-Katalog (Moll et al. 1982; Moll, Schiller, and Franke 1990) um polymorphe, individuelle Variationen ergänzt werden muß (Celis et al. 1994; Korge et al. 1992; Lobeck et al. 1989; Mischke and Wild 1987). Da in Anbetracht der Vielzahl unterschiedlicher Rassen auch beim Hund ein CK-Polymorphismus angenommen werden muß, wurde in dieser Studie das Zytokeratinvorkommen in Hautproben unterschiedlicher Hunderassen untersucht.

Material & Methoden

Hautproben (jeweils etwa 2x2 cm groß) aus der seitlichen Brustwand von unterschiedlichen, hautgesunden Rassen (5 Deutsche Schäferhunde, 5 Boxer, 5 Cocker Spaniel, 5 Yorkshire Terrier, 5 Mischlinge) wurden bei der Sektion – spätestens jedoch 18 Stunden post mortem – gewonnen. Die Proben wurden geteilt, wobei eine Hälfte unmittelbar nach Entnahme nativ für die Zytokeratinpräparation der Epidermis benutzt wurde. In der anderen Hälfte wurden – nach einer Fixierung in 4%igem Formalin für 24 Stunden – die Epidermis und Adnexen immunhistochemisch weiter untersucht.

Zytokeratin-Präparation und -Separation

Nach Einbringen der Hautproben in ein Wasserbad von 60 °C für 5 Minuten wurde die Epidermis mit einem Skalpellrücken abgepellt. Aus diesem Material wurde die Zytokeratinextraktion nach der von Achtstaetter et al. (Achtstaetter et al. 1986) beschriebenen Methode vorgenommen: 0,5 g des abgepellten Materials wurden mechanisch weiter zerkleinert und in 2 ml Homogenisierungspuffer (96 mM NaCl, 8 mM KH₂PO₄, 5,6 mM Na₂HPO₂•2H₂O, 1,5 mM KCl, 10 mM EDTA und 0,1 mM DTT) mittels eines Homogenisators (Potter, Fa. Braun, Melsungen) bei 1.500 rpm 3 Minuten lang homogenisiert. Das Homogenisat wurde in 100 µl Aliquots aufgeteilt und die Zytokeratinfraktion in einer Extraktionslösung (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1,5 M KCl, 5 mM DTT und 1 % Triton X-100) bei 4°C für 30 min herausgelöst. Nach einer Zentrifugation mit 10.000 g bei 4 °C für 3x 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die eindimensionale Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) wurde nach der Standardmethode von Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Ein 12,5%iges Gel, gegossen aus Acrylamid und Bisacrylamid in einem Verhältnis von 200:1, wurde dazu eingesetzt. Jeder Gel-Lauf wurde im doppelten Ansatz durchgeführt, wobei jeweils 5 Proben und ein Molekulargewichtsmarkergemisch (Dalton Marker VII-L; Fa. Sigma, Deisenhofen) aufgebracht wurden. Nach dem Elektrophoreselauf wurde ein Gel mit Coomassie Blue gefärbt und mehrere Stunden entfärbt. Nach dem Entfärben wurde das Gel zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und mit einem Scanner (Scanjet II cx, Fa. Hewlett Packard) digitalisiert. Die aufgetrennten Proteine des zweiten (ungefärbten) Gels wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (Millipore Filters, Typ HA mit 0,45 µm Porengröße) in einer Blotkammer elektrotransferiert (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979). Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Membranen mit 0,5%igem Ponceau-S gefärbt, die Banden als Streifen ausgeschnitten und in Aqua dest. wieder entfärbt. Zum spezifischen Zytokeratinnachweis wurden die Membranstreifen bei Raumtemperatur zunächst 2x 30 min mit 3% BSA in TRIS-HCl Puffer inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen in einem Waschpuffer (TRIS-HCl mit 1% Tween 20) wurden die Membranstreifen mit den Antikörpern (Tab. 4.3.1-1) für 18 h bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschvorgang wurde ein Anti-Maus-Konjugat aus der Ziege, das mit Alkalischer Phosphatase markiert ist (# M 30008, Fa. Medac, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:1000 bei 37 °C für 120 min zugegeben. Nach einer weiteren Waschung wurde die Visualisierungsreaktion mit 0,6 mg/ml Fast Red Salz/0,4 mg/ml Naphtol AS-MX Phosphat/TRIS-HCl Puffer (0,2 M, ph 8,0) bei 37 °C für 30 min durchgeführt und die Membranstreifen abschließend in Aqua dest. gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Ergebnisse mit einem HPScanjet II cx digitalisiert.

Die digitalisierten Ergebnisse wurden auf einem Macintosh-Computer (Quadra 660 AV) mit Hilfe des Public Domain-Programms NIH Image (entwickelt vom U.S. National Institutes of Health, erhältlich im Internet bei <http://rsb.info.nih.gov/-nih-image/>) ausgewertet.

Antikörper

Zum Einsatz kamen 13 monoklonale Antikörper (mAk's) gegen verschiedene Zytokeratine: AE1, AE3, KL1, CAM 5.2, LP34, CK 7, CK 10, CK 13, CK 14, CK17, CK 18, CK19, and CK 20. Details dieser mAk's sind in der Tabelle 4.3.1-1 aufgeführt.

Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie kam eine leicht modifizierte Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische

Tabelle 4.3.1-1
Monoklonale Antikörper für APAAP und Western Blot

Antikörper	Spezifität	Verdünnung APAAP	Verdünnung Western Blot	Bezugsquelle
AE1	CK 10,14,16,19	1:400	1:1000	ICN
AE3	CK 1, 5, 8	1:400	1:1000	ICN
KL1	CK 10/11	1:100	1:1500	Immunotech
CAM 5.2	CK 8/18	ready to use	1:10	Becton Dickinson
LP 34	CK 6, 18	1:100	1:1500	Dako
Ks 7.18	CK 7	1:50	1:1000	Progen
DE-K10	CK 10	1:100	1:1500	Dako
AE 8	CK 13	1:10	1:200	BioGenex
LL002	CK 14	1:20	1:200	Serotec
E3	CK 17	1:20	1:400	Dako
Ks 18.04	CK 18	1:20	1:400	Progen
Ks 19.1	CK 19	1:10	1:200	Progen
CK 20	CK 20	1:10	1:100	PD Dr. R. Moll, Mainz

Phosphatase (APAAP)-Technik (Cordell et al. 1984) zum Einsatz. Die APAAP-Reagenzien wurden dem APAAP-Kit (# ADS 101) der Fa. Dianova, Hamburg, entnommen. Entparaffinierte, etwa 5 µm dicke Schnitte wurden in einem Mikrowellenherd erhitzt (2 x 5 mins. bei 600W in 10mM Zitratpuffer, pH 6,0). Nach dreimaligem Spülen in TRIS-Puffer, wurden die Schnitte auf Coverplates® (Fa. Shandon, Frankfurt/ Main) montiert und die folgenden Reaktionen in der semiautomatisierten Färbestation Sequenza® (Fa. Shandon, Frankfurt/Main) vorgenommen. Für 30 min wurden bei Raumtemperatur die Schnitte mit in RPMI verdünnten primären Antikörpern (Tabelle 4.3.1-1) inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit TRIS-Puffer wurde der sekundäre Antikörper (1:100 verdünnt in RPMI mit Zusatz von 5 % normalem Hundeserum) für 30 min zugesetzt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde der APAAP-Komplex für 30 min zugesetzt. Nach einem zusätzlichen Waschvorgang wurde eine Reaktion mit Hilfe der Substrat-(Naphthol-AS-MX-Phosphat gelöst in N,N-Dimethylformamide unter Zusatz von 1M Levamisole) -Fast Red Lösung (Sigma, Deisenhofen) visualisiert. Als Negativkontrollen wurden Konsekutivschnitte herangezogen, bei denen der primäre Antikörper durch ein nichtimmunes Mausserum (Dianova) ersetzt wurde.

Die Immunreaktionen wurden semiquantitativ ausgewertet: Der relative Anteil von immunreaktiven Zellen wurde mikroskopisch in 10 Gesichtsfeldern bei 250facher Vergrößerung bestimmt und wie folgt „gescored“:

- [—]: keine immunreaktive Zellen,
- [1+]: 10 % immunreaktive Zellen
- [2+]: 11-50 % immunreaktive Zellen
- [3+]: 51-75 % immunreaktive Zellen oder
- [4+]: 75 % immunreaktive Zellen.
- a blaßrosafarbene Färbeintensität
- b leuchtend rosarote Färbeintensität
- c kräftige, leuchtend-rote Färbeintensität.

Eine [1+] Färbung wurde als insuffizient gewertet.

Ergebnisse

In allen untersuchten 25 Hautproben konnten mittels SDS-PAGE 5 Banden

identifiziert werden, deren Molekulargewicht jeweils etwa 67, 58, 56, 50 und 48 kD betrug (Abbildung 4.3.1-1). Dem Molekulargewicht nach entspricht dies den Zytokeratinen CK 1, CK 5, CK 6 (bzw. CK 10/11), CK 14 und CK 16 des menschlichen Zytokeratinkatalogs (Moll et al. 1982). Geringgradig unterschiedliche Laufweiten bei CK1 und CK 5 scheinen auf interindividuelle Variationen hinzudeuten. Bei einigen Individuen konnte ein Doppelpeak bei CK1 und/oder CK 10/11 festgestellt werden (Abbildung 4.3.1-2). Insgesamt konnte bei 2 Deutschen Schäferhunden, 4 Boxern, 1 Cocker Spaniel, 4 Yorkshire Terrier und bei 4 Mischlingen ein Doppelpeak bei CK 1 und/oder bei CK 10 entdeckt werden (Tabelle 4.3.1-2).

Zusätzlich waren in allen SDS-Gelen eine große Bande von (wahrscheinlich) Fillagrin sowie drei Histonen-Banden sichtbar (Abbildung 4.3.1-1). Bei einem Boxer tauchte eine zusätzliche Bande unklarer Herkunft auf, die mit den eingesetzten Antikörpern nicht immunreaktiv war.

Im Western Blot konnten mit folgenden eingesetzten Antikörpern distinkte Zytokeratine – in Analogie zum Zytokeratinkatalog des Menschen (Moll et al. 1982) – nachgewiesen werden:

- AE1 erkannte CK 10, 14, 16,
- AE3 erkannte CK 1, 5,
- KL 1 erkannte CK 10/11,
- LP 34 erkannte CK 6 und
- LL002 erkannte CK14.

Die Kombination AE1/AE3 empfahl sich dabei als Panzytokeratinmarker für die Epidermis, um alle CK-Banden zu färben. Da im SDS-PAGE die CK 6 und CK 10/11 gleich weit laufen, konnte die Anwesenheit von CK 6 bzw. CK 10 erst im Western Blot nach der Färbung mit LP 34 bzw. KL1 nachgewiesen werden (Abbildung 4.3.1-3).

Auch in der immunhistochemischen Färbung ergaben nur 5 der eingesetzten Antikörper zufriedenstellende Resultate:

- AE1 mit einer [4+]^c-Reaktion (Abbildung 4.3.1-4),
- KL1 mit einer [4+]^c-Reaktion,
- LL002 mit einer [4+]^a-Reaktion (Abbildung 4.3.1-5),
- LP 34 mit einer [4+]^c-Reaktion (Abbildung 4.3.1-6) und
- AE 3 mit einer [3+]^a-Reaktion.

Diese Antikörper reagierten in der Epidermis mit folgenden Reaktionen (siehe auch Tabelle 4.3.1-3): LL002 (CK 14; Abbildung 4.3.1-5) färbte nur die Basalzellschicht, basale und suprabasale Zellen wurden von LP 34 (CK 6/18; Abbildung 4.3.1-6) und AE3 markiert, während KL1 (CK 10/11) und AE1 (Abbil-

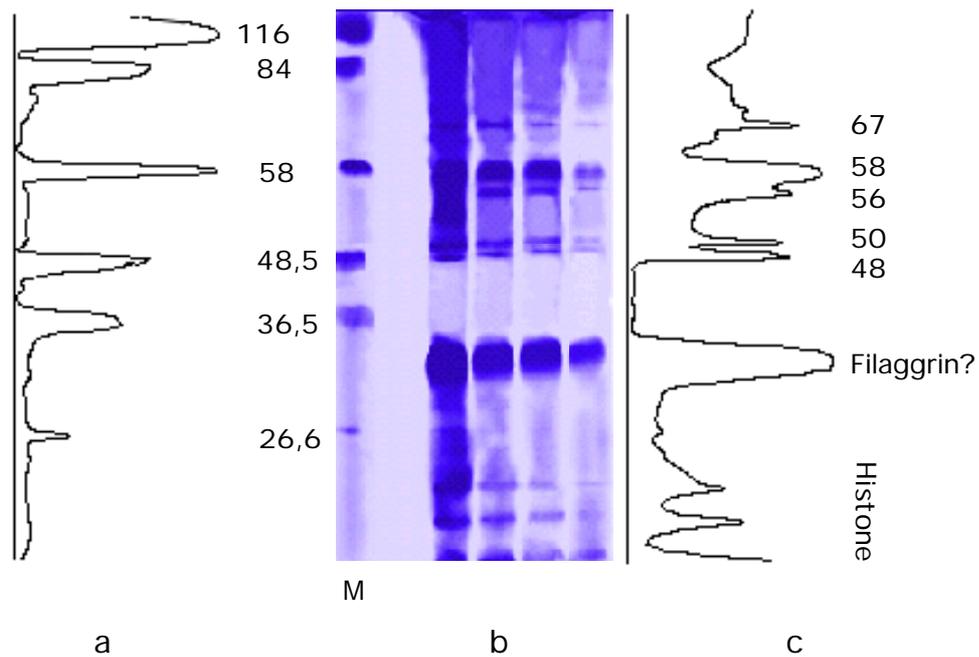


Abbildung 4.3.1-1

SDS-Page der normalen Epidermis mit Densito-Blots (von NIH-Image generiert). a) Dichte-Plot der Markerproteine, b) SDS-Page in 4 verschiedenen Konzentrationen, c) Dichte-Plot der Epidermisproteine. Die mit der Hilfe der Plots errechneten Molekulargewichte (kD) in c) entsprechen von oben nach unten den Zytokeratinen 1, 5, 6 (bzw. 10/11), 14 und 16. 12,5 % Gel, Coomassie-Blue. M=Markerproteine.

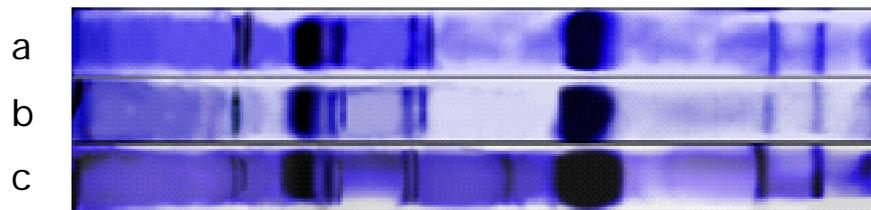
Abbildung 4.3.1-5) nur in den suprabasalen Zellen immunreaktiv war.

Diskussion

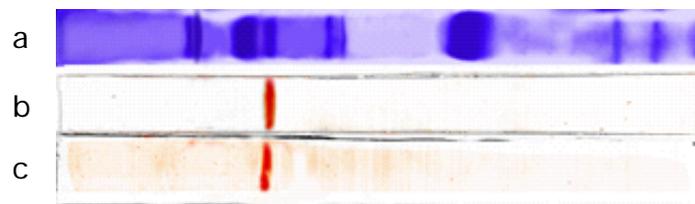
Die Zytokeratinzusammensetzung der Epidermis des Hundes scheint nicht zuletzt durch die Vielzahl von Rassen, die bereits morphologisch Unterschiede in der Epidermis aufweisen (Schwarz et al. 1979), einem ähnlichen Polymorphismus zu unterliegen wie er beim Menschen beschrieben wird (Celis et al. 1994;

Tabelle 4.3.1-2
Auswertung der Densito-Plots: Polymorphe Zytokeratine

Rasse	n	CK 1a/1b	CK 10a/10b	CK 1a/b & 10a/b
Deut. Schäferhund	5	0	0	2
Boxer	5	3	1	0
Cocker Spaniel	5	1	0	1
Yorkshire Terrier	5	3	1	0
Mischling	5	3	1	1
Summe	25	10	3	4

**Abbildung 4.3.1-2**

Polymorphismus der Zytokeratine der Epidermis: a) Variation in CK 1 mit Doppelpeak (*CK 1a/b), b) Variation in CK 10 mit Doppelpeak (**CK 10a/b) und c) Variation in CK 1 und CK 10 (CK 1a/b und CK a/b). 12,5 % SDS-Page; Coomassie-Blue

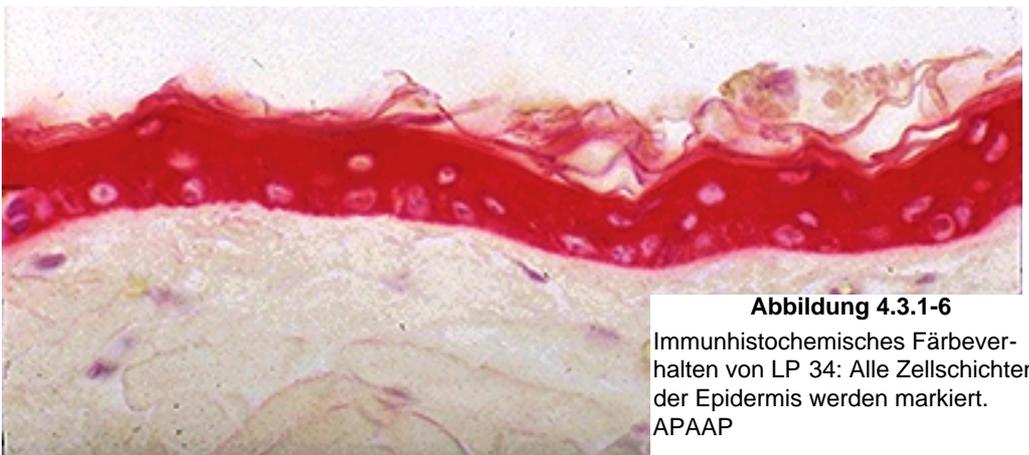
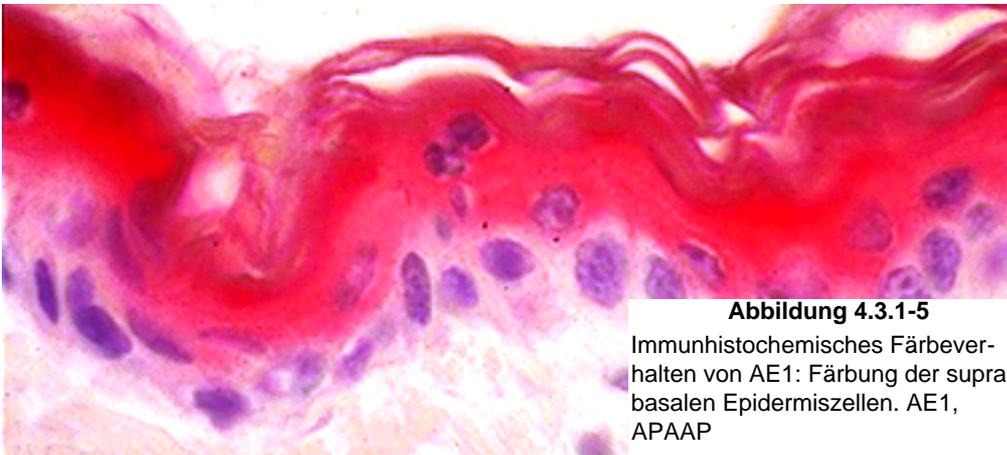
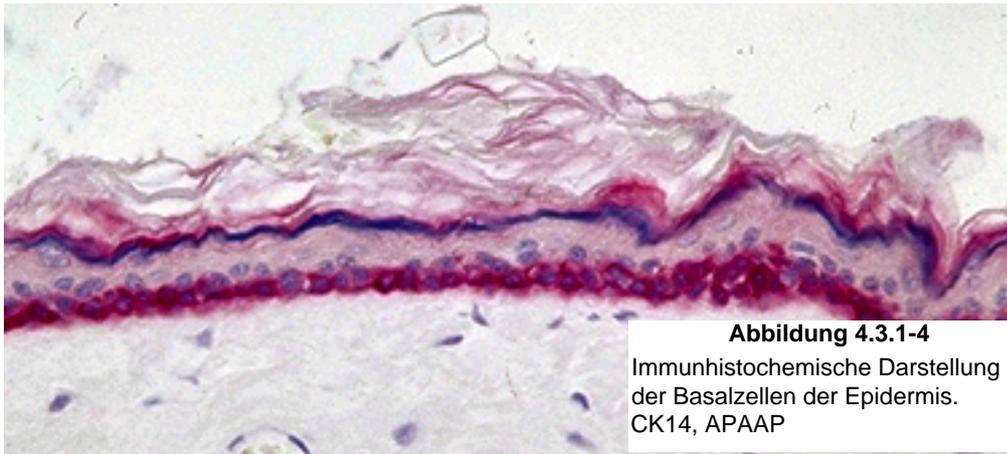
**Abbildung 4.3.1-3**

Nachweis der Anwesenheit der Zytokeratine 6 und 10: a) SDS-Page der Epidermis. Western Blot markiert mit b) KL1 (CK 10/11) sowie c) LP 34 (CK 6/18).

Tabelle 4.3.1-3

Immunhistochemische Reaktivität der Epidermis

<i>Antikörper</i>	<i>Basal</i>	<i>Suprabasal</i>
AE1	-	+
AE3	+	+
KL1	-	+
CAM 5.2	-	-
LP 34	+	+
CK 7	-	-
CK 10	-	-
CK 13	-	-
CK 14	+	-
CK 17	-	-
CK 18	-	-
CK 19	-	-
CK 20	-	-



Korge et al. 1992; Mischke and Wild 1987; Wild and Mischke 1986). Wie die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, waren im eindimensionalen SDS-PAGE zumindest für die Zytokeratine 1 und 10 polymorphe Varianten bei allen untersuchten Rassenschlägen zu beobachten.

Der reguläre Nachweis von CK 6 in unveränderter Epidermis aller untersuchten Hunde ist allerdings überraschend, da dies beim Menschen so nicht beobachtet werden kann. Bei der Epidermis des Menschen ist die CK-Expression durch eine klare Trennung in basales und suprabasales Kompartiment gekennzeichnet: Basal werden die CK 5, 14 und 15 und suprabasal CK 1 und 10 gefunden (Moll 1993). Erst bei hyperproliferativen Hautprozessen oder in belasteten Hautbereichen wie der Fußsohle tauchen zusätzlich CK 6 und 16 auf (Moll and Moll 1985; Stoler et al. 1988; Weiss, Eichner, and Sun 1984), was wahrscheinlich mit einer reduzierten Expression von CK 1 und CK10 zusammenhängt (Stoler et al. 1988). Keratinozyten in besonders belasteter Epidermis benötigen offensichtlich einen zusätzlichen Stabilisierungsfaktor; und das ist wahrscheinlich die funktionelle Aufgabe von CK 6 and CK 16 (Jiang et al. 1993). Die Epidermis des Hundes weist etwa 3-6 Layer auf und ist damit etwa 3fach dünner als die des Menschen (Schwarz et al. 1979). Da die Haut des Hundes allerdings gleichartigen Belastungen wie die Haut des Menschen ausgesetzt ist, muß die Zytokeratin-Ausstattung des Hundes offensichtlich dem Rechnung tragen: Den Ergebnissen dieser Studie nach scheinen beim Hund basal CK 1, CK 5, CK 6 und CK 14 exprimiert zu werden, die suprabasal durch CK 4, 10/11, 14 und wahrscheinlich 15/16 ergänzt werden. Da im SDS-PAGE die CK 6 and CK 10 gleich weit laufen, konnte die Anwesenheit von CK 6 erst im Western Blot nach der Färbung mit LP 34 nachgewiesen werden.

Ein ähnlich überraschendes Verhalten konnte für den Antikörper AE1 festgestellt werden: Beim Hund ist AE1 nur suprabasal reaktiv, beim Menschen nur basal. Erst unter Belastungen verändert sich beim Menschen die Expression: AE1 wird basal nicht mehr dargestellt, taucht dafür suprabasal auf; zusätzlich wird CK 6 neoexprimiert (Watanabe et al. 1991).

Damit scheint die Epidermis des Hundes komplexer als die des Menschen zu sein und erreicht – obwohl sie dünner ist – wahrscheinlich so eine vergleichbare Festigkeit. Methodisch bleibt festzuhalten, daß am Paraffinschnitt die mAk's LL002, AE3 und LP 34 die Basalzellschicht der Epidermis färben, während die suprabasalen Schichten von AE1, KL1, AE3 und LP 34 visualisiert werden. Sowohl LP 34 als auch die Kombination AE1/AE3 empfehlen sich somit als Pan-Epidermismarker.

Bei der bei einem Boxer beobachteten zusätzlichen Zytokeratinbande könnte es sich um ein Degradationsprodukt eines Zytokeratins handeln, dessen Epitope

von den eingesetzten Antikörpern nicht erkannt wird (Celis et al. 1994).

Diese Untersuchung ist ein erster Schritt zu einem caninen Zytokeratinkatalog. Zur endgültigen Erstellung sind allerdings weiterführende Untersuchungen und Methoden nötig: Neben dem Einsatz einer zweidimensionalen SDS-Elektrophorese, könnte durch Nachweis von spezifischer mRNA ein Katalog erstellt werden, obwohl Gensequenzen für canine Intermediärfilamente zur Zeit nicht bekannt sind wie Internet-Recherchen gezeigt haben: Nachforschungen beim *European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.embl-heidelberg.de/>) blieben ebenso erfolglos wie beim *Dog-Genom-Project* (<http://mendel.berkeley.edu/dog.html>).

Literatur

- Achtstaetter, T., M. Hatzfeld, R.A. Quinlan, D.C. Parmelee, and W.W. Franke. 1986. Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods in Enzymology* 134:355 - 371.
- Andreasen, C.B., E.A. Mahaffey, and J.R. Duncan. 1988. Intermediate filament staining in the cytologic and histologic diagnosis of canine skin and soft tissue tumors. *Veterinary Pathology* 25:343-349.
- Cardona, A., B.R. Madewell, D.K. Naydan, and J.K. Lund. 1989. A comparison of six monoclonal antibodies for detection of cytokeratins in normal and neoplastic canine tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1:316-323.
- Celis, Julio E., Hanne Holm Rasmussen, Eydfinnur Olsen, Peder Madsen, Henrik Lefers, Bent Honoré, Kurt Dejgaard, Paul Gromov, Henrik Vorum, Alex Vassilev, Yasemin Baskin, Xiangdang Liu, Ariana Celis, Bodil Basse, Jette B. Lauridsen, Gitte P. Ratz, Annette H. Andersen, Else Walbum, Inge Kjærgaard, Inger Andersen, Magda Puype, Josef Van Damme, and Joel Vandekerckhove. 1994. The human keratinocyte two-dimensional protein database (update 1994): Towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases. *Electrophoresis* 15:1349-1458.
- Cordell, J.L., B. Falini, W.N. Erber, A.K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K.A.F. Pulford, H. Stein, and D.Y. Mason. 1984. Immunoencytometric labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32:219 - 229.
- Ferrer, L., R. M. Rabanal, D. Fondevila, and N. Prats. 1990. Immunocytochemical demonstration of intermediate filament proteins, S-100 protein and CEA in apocrine sweat glands and apocrine gland derived lesions of the dog. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 37:569-576.
- Fuchs, E. 1995. Keratins and the skin. *Annual Review of Cell and Development Biology* 11:123-153.

- Jiang, C.-K., T. Magnaldo, M. Ohtsuki, I.M. Freedberg, F. Bernerd, and M. Blumenberg. 1993. Epidermal growth factor and transforming growth factor a specially induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins K6 and K16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:6786-6790.
- Korge, B.P., S.-Q. Gan, O.W. McBride, D. Mischke, and P.M. Steinert. 1992. Extensive size polymorphism of the human keratin 10 chain resides in the C-terminal V2 subdomain due to variable numbers and sizes of glycine loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:910 - 914.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680 - 685.
- Lobeck, H., I. Bartke, K. Naujoks, D. Müller, G. Bronhöft, D. Mischke, and G. Wild. 1989. Verteilungsmuster der Zytokeratinpolypeptide 4 und 5 im normalen und neoplastischen Epithel unter Verwendung neuer paraffingängiger monoklonaler Antikörper (eine immunhistochemische Untersuchung). *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 73:645.
- Mischke, D., and G. Wild. 1987. Polymorphic keratins in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 88:191 - 197.
- Moll, I., and R. Moll. 1985. Cells of extramammary Paget`s disease express cytokeratins different from those of epidermal cells. *Journal of Investigative Dermatology* 84:3-8.
- Moll, Roland, ed. 1993. *Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren*. Edited by G. Seifert. Vol. 142, Veröffentlichungen aus der Pathology (Progress in Pathology). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia tumors and cultured cells. *Cell* 31:11 - 24.
- Moll, R., D.L. Schiller, and W.W. Franke. 1990. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *Journal of Cell Biology* 111:567 - 580.
- Rabanal, R.H., D. Fondevila, V. Montane, M. Domingo, and L. Ferrer. 1989. Immunocytochemical diagnosis of skin tumours of the dog with special reference to undifferentiated types. *Research in Veterinary Science* 47:129 - 133.
- Schwarz, R., J.M.W. Le Roux, R. Schaller, and K. Neurand. 1979. Micromorphology of the skin (epidermis, dermis, subcutis) of the dog. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 46:105-109.
- Stoler, A., R. Kopan, M. Duvic, and E. Fuchs. 1988. Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *Journal of Cell Biology* 107:427 - 446.
- Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.

- Watanabe, S., K. Wagatsuma, E. Ichiwaka, and H. Takahashi. 1991. Abnormal distribution of epidermal protein antigens in psoriatic epidermis. *Journal of Dermatology* 18: 143-151.
- Weiss, R.A., R. Eichner, and T.T. Sun. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-Kdalton keratin as molecular marker for hyperproliferative keratinocytes. *Journal of Cell Biology* 98:1397 - 1406.
- Wild, G.A., and D. Mischke. 1986. Variation and frequency of cytokeratin polypeptide patterns in human squamous non-keratinizing epithelium. *Experimental Cell Research* 162:114 - 126.

4.3.2 Das Zytokeratinprofil caniner epithelialer Hauttumoren

Einleitung

Neoplasien der Haut gehören wahrscheinlich zu den häufigsten Geschwülsten bei Hunden: In den wenigen Untersuchungen, die auf eine definierte Hundepopulation zurückgreifen konnten, wurden Prävalenzen von nahezu 70 % festgestellt und eine Inzidenzrate von über 1.000 Fällen/100.000 Hunden/Jahr postuliert (Dorn et al. 1966; Dorn et al. 1968a; Dorn et al. 1968b; MacVean et al. 1978; Strafuss 1985). Trotz dieser Häufigkeit wurden seit dem Tumor-Projekt der WHO aus den 70er Jahren (Weiss and Frese 1974; Weiss, Frese, and Rudolph 1977) insgesamt relativ wenig grundlegende Arbeiten zu Hauttumoren des Hundes publiziert. Aus diesem Grund wird mit dieser Arbeit der Versuch unternommen, Basisdaten zur Expression von Intermediärfilamenten, insbesondere Zytokeratinen, in neoplastisch veränderter Haut des Hundes zu gewinnen, um folgende Fragen beantworten zu können:

- Gibt es beim Hund eine hauttypische Expression von Zytokeratinen und
- kann durch eine detaillierte Analyse des Zytokeratinmusters ein "Typing" für verschiedene Hauttumoren ermöglicht werden?

Das Expressionsmuster der Zytokeratine empfiehlt sich deshalb, da die Zytokeratinexpression zumindest beim Menschen eine bemerkenswert eindeutige Gewebespezifität aufweist, die auch bei neoplastischer Transformationen beibehalten wird (Moll 1993; Moll et al. 1982a).

Material & Methoden

Hautproben

Aus dem Biopsiegut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin wurden neben Proben unveränderter Haut, epidermale Tumoren (25 Basalzelltumore, 25 Plattenepithelkarzinome, 25 intrakutan verhornende Epitheliome, 25 Papillome, 25 Fälle von entzündlich-hyperplastischen Tumoren), Haarfollikeltumore (25 Trichoepitheliome, 25 Epitheliomas malherbe), Tumore der Talgdrüsen (10 Adenome, 10 Karzinome), 10 Tumore der hepatoiden Drüsen, Tumore der Schweißdrüsen (10 Adenome, 5 Karzinome) und 10 Karzinome der Analbeuteldrüsen, die alle einheitlich entsprechend der WHO-Klassifikation (Weiss and Frese 1974; Weiss, Frese, and Rudolph 1977) (re)klassifiziert wurden, immunhistochemisch untersucht. Alle Proben waren in 4%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und wurden zunächst mit Hämatoxilin & Eosin (HE) gefärbt.

Immunhistochemie¹

Zur immunhistochemische Untersuchung der Proben wurde eine modifizierte APAAP (Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase)-Methode (Cordell et al. 1984) eingesetzt, die wie folgt durchgeführt wurde: Entparaffinierte Schnitte von etwa 5 µm Dicke wurden entweder in einem Mikrowellenherd (2x5 min bei 600 W in 10 mM Zitratpuffer bei pH von 6,0) erhitzt oder mit Protease (Pronase E, Sigma P-6911: 0,1 % bei 37 °C für 5 min) vorbehandelt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in TRIS-Puffer gewaschen und auf Coverplates[®] (Shandon, Frankfurt/Main) montiert. Die primären Antikörper gegen Zytokeratine (Tabelle 4.3.2-1) wurden in RPMI-Puffer verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur in die Coverplates eingebracht. Nach Waschen mit TRIS-Puffer wurde der sekundäre Antikörper (Dianova ADS 101) für 30 min bei Raumtemperatur aufgebracht, nach weiterer TRIS-Pufferwaschung für 30 min der APAAP-Komplex (Dianova ADS 101). Nach einem letztmaligen Waschvorgang wurde eine stattgefundene Reaktion mit Substrat (Naphthol-AS-MX-Phosphat in N,N,-Dimethylforamide) – Fast Red Lösung, die zur Blockade endogener Enzymaktivität 1 M Levamisole enthält, visualisiert. Als Positivkontrolle diente in der Vorversuchsphase Haut vom Menschen (freundlicherweise vom Institut für Pathologie, Benjamin-Franklin-Klinikum der FU Berlin, Leiter Prof. H. Stein, zur Verfügung gestellt). Negativkontrolle waren Konsekutivschnitte aus dem gleichen Block wie die zu untersuchende Probe, die anstelle des Primärsersums mit einem nichtimmunogenen Mausserum (Dianova) inkubiert wurden. Die gesamte Prozedur wurde in dem Immunfärbecenter Sequenza[®] (Shandon) vorgenommen.

Die Immunreaktionen wurden semiquantitativ ausgewertet, wobei der relative Anteil immunreaktiver Zellen an den (normalen oder neoplastischen) Epithelzellen bei 250facher Vergrößerung wie folgt bewertet wurde:

- [—]: keine immunreaktive Zellen,
- [1+]: 10 % immunreaktive Zellen
- [2+]: 11-50 % immunreaktive Zellen
- [3+]: 51-75 % immunreaktive Zellen oder
- [4+]: 75 % immunreaktive Zellen.
- a blaßrosafarbene Färbeintensität
- b leuchtend rosarote Färbeintensität
- c kräftige, leuchtend-rote Färbeintensität.

Eine [1+] Färbung wurde als insuffizient gewertet.

¹Eine ausführliche Beschreibung der immunhistochemischen Methodik findet sich im Anhang A

Tabelle 4.3.2-1
Benutzte monoklonale Antikörper gegen Zytokeratine

<i>Antikörper</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Verdünnung</i> <i>APAAP</i>	<i>Bezugsquelle</i>
AE1	CK 10,14,16,19	1:400	ICN
AE3	CK 1, 5, 8	1:400	ICN
KL1	CK 10/11	1:100	Immunotech
CAM 5.2	CK 8/18	ready to use	Becton Dickinson
LP 34	CK 6, 18	1:100	Dako
Ks 7.18	CK 7	1:50	Progen
DE-K10	CK 10	1:100	Dako
AE 8	CK 13	1:10	BioGenex
LL002	CK 14	1:20	Serotec
E3	CK 17	1:20	Dako
Ks 18.04	CK 18	1:20	Progen
Ks 19.1	CK 19	1:10	Progen
CK 20	CK 20	1:10	PD Dr. R. Moll, Mainz

Ergebnisse

Immunhistochemie orthologischer Haut

Im vorherigen Kapitel 4.3.1 wurde bereits die immunhistochemische Reaktivität der Epidermis dargestellt, die durch die Reaktivität adnexaler Strukturen hier ergänzt wird.

Weder innere Haarwurzelscheide, Haarfollikel noch das Haar selbst konnten mit den eingesetzten Antikörpern gefärbt werden. Lediglich die Haarmedulla zeigte variabel eine Anfärbbarkeit mit AE1 und LP34 mit [3+]c- und [4+]c-Reaktionen. Die äußere Wurzelscheide verhielt sich immunhistochemisch ähnlich wie die Epidermis: Die äußerste Zellschicht reagierte nur mit AE3, LL002 und LP 34 in [+] -Quantität (Qualität jeweils c, außer bei AE3, wo eine a-Reaktion vorlag). Die inneren Zellschichten reagierten mit AE1 [4+]c, AE3 [4+]a, KL1 [4+]c und LP34 [4+]c.

Die Basalzellen der Talgdrüsen konnten mit LP34 bei einer [4+]c -Reaktion dargestellt werden. Mit AE1 und AE3 konnten [2+]c- bzw. [2+]a-Reaktionen mit LL002 [4]a-Ergebnisse erzielt werden. Die Klarzellen der Talgdrüsen reagierten nur mit LP34 in einer [4+]c-Reaktion. Die hepatoiden Drüsen (Perianaldrüsen) als modifizierte Talgdrüsen reagierten ähnlich: Alle Drüsenanteile waren mit

LP34 [4+]c-reaktiv, mit LL002 [4+]a-reaktiv, während AE3 die Reservezellen [4+]c und die eigentlichen hepaotiden Zellen [4+]a färbte.

Das Myopepithel der paratrichialen Schweißdrüsen war mit LP34 in einer [4+]c-Reaktion darstellbar. Sekretorisches Epithel und Gangepithelien reagierten mit AE1, CAM 5.2 und Ks 19.1 [4+]c, mit AE3 [4+]a und mit Ks18.04 in [3+]b. Entsprechend ihrer Schweißdrüsenherkunft reagierten Analbeuteldrüsen immunhistochemisch gleichartig.

Immunhistochemie pathologisch veränderter Haut

In allen 25 Fällen mit **hyperplastischer und entzündlich veränderter Epidermis** waren gleichartige Ergebnisse wie bei der unveränderten Epidermis (siehe Kapitel 3.2.4.1) zu beobachten: Ausschließlich basal reagierte nur LL002 (CK 14) in einer [4+]a-Reaktion, basal und suprabasal reagierten LP34 (CK 6/16) in einer [4+]c – und AE3 in einer [4+]a – Reaktion, nur suprabasal reagierten AE1 sowie KL1 (CK 10/11) mit [4+]c. AE1 reagierte allerdings in 5 Fällen nur mit [2+]c und in 4 Fällen gar nicht. Die gleichen 4 Fälle waren auch weder mit LL002, KL1, AE3 noch mit LP34 anfärbbar.

Gleichartige Färbemuster zeigten die untersuchten **Papillome**; 3 Fälle färbten nicht, in 5 Fällen waren AE1 und AE3 nur als [2+]c bzw. [2+]a markierbar und in 2 Fällen reagierten LL002, KL1 und AE1 in [2+]c-Quantität.

Bei den 25 untersuchten **Plattenepithelkarzinomen** konnten unabhängig vom Differenzierungsgrad folgende Reaktivitäten festgestellt werden:

Reaktivität	LP34	AE1	KL1
[4+]	19	21	20
[3+]	4	1	1
[2+]	1	0	1
negativ	1	3	3
Summe	25	25	25

Die basalen Zellen **intrakutan verhornender Epitheliome** färbten sich mit LL002, AE3 und LP34. Fokale Herde mit weitergehenden Differenzierungen konnten in 16 Fällen zusätzlich mit AE1 und KL1 markiert werden. In den zentralen Hohlräumen konnte die Anwesenheit von „Soft-Keratin“ durch die Anfärbbarkeit mit LP34, AE1 oder KL1 in allen Fällen verifiziert werden.

Reaktivität	LP34	LL002	AE3	AE1	KL1
[4+]	17	21	12	0	0
[3+]	6	3	9	0	0
[2+]	1	0	2	0	0
[1+]	0	0	0	16	16
negativ	1	1	2	9	9
Summe	25	25	25	25	25

Alle Varianten von **Basalzelltumoren** zeigten ein gleiches Färbeverhalten: Die dominierenden Basalzellen waren mit LP34, LL002 und AE3 markierbar; fokale Differenzierungen färbten sich zusätzlich mit AE1 und KL1 (jeweils in einer [1+]-Reaktivität). Im einzelnen ergab sich folgendes Ergebnis:

Reaktivität	LP34	LL002	AE1	AE3	KL1
[4+]	17	15	0	0	0
[3+]	0	1	0	1	0
[2+]	1	1	0	1	0
[1+]	2	2	2	17	4
negativ	5	6	23	6	21
Summe	25	25	25	25	25

Bei den **Trichoepitheliomen** sah das Färbeergebnis wie folgt aus:

LP34, LL002, AE1 und AE3 waren negativ in 5 Fällen,
 LP34 und LL002 waren [4+] in 15 Fällen,
 LP34 war [4+] in 2 Fällen,
 LL002 war [3+] in 1 Fall und
 LP34 und LL002 waren [2+] 2 Fällen.

Vereinzelte Abschnitte zeigten weitergehende Differenzierungen, angezeigt durch Reaktion mit AE1, AE3 und LP34. Die Hornzysten färbten entsprechend ihrer Hartkeratinzusammensetzung nicht.

Pilomatrixoma (Epithelioma *malherbe*) konnten mit keinem der eingesetzten Antikörper markiert werden. Selbst Zysteninhalt war bis auf gelegentliche Anfärbbarkeit einzelner Areale immunhistochemisch negativ.

In Adenomen der **Schweißdrüsentumoren** ließen sich folgende Immunreaktionen bestimmen: Die äußeren Zellagen reagierten in 8 Fällen mit LP34 [4+]c und in 2 Fällen [3+]c; sie waren alle CAM5.2 negativ. Die inneren Zellen waren in 8 Fällen mit CAM 5.2 [4+]c und in 2 Fällen mit [2+]c anfärbbar; mit AE1 reagierten 5 Fälle mit [4+]c, 3 Fälle mit [3+]c und 2 Fälle mit [2+]c. Ks 18.04 war in 6 Fällen [3+]a-reaktiv, in einem Fall [2+]a-reaktiv und dreimal negativ. Ks 19.1 färbte gleichmäßig alle Anteile von 8 Fällen mit [3+]c; in 2 Fällen konnte lediglich eine [2+]c-Reaktivität beobachtet werden. Die fünf Karzinome färbten sich in 5 Fällen mit CAM 5.2. [4+]c, mit AE1 dreimal [4+]c und zweimal [2+]c, mit Ks 18.04 sowie mit Ks 19.1 zweimal [4+]c, zweimal [2+]c und einmal gar nicht.

Adenome und Karzinome der **Talgdrüsen** exprimierten LP34 und LL002 in folgender Art und Weise:

Reaktivität	LP34 (Ca)	LL002 (Ca)
[4+]	6 (5)	6 (7)
[3+]	3 (4)	0 (0)
[2+]	0 (1)	4 (1)
negativ	1 (0)	0 (2)
Summe	10 (10)	10 (10)

Neoplasien der **hepatoiden Drüsen** reagierten mit LP34 (Adenome: achtmal mit [4+]c und zweimal mit [2+]c; Karzinome: achtmal mit [3+]c und zweimal mit [2+]c) sowie mit LL002 (Adenome: sechsmal in [4+]c, einmal mit [3+]c und dreimal in [2+]c; Karzinome: einmal mit [4+]c, achtmal mit [3+]c und einmal mit [2+]c. Reservezellen waren zusätzlich in allen Fällen mit AE3 in [3]c-Quantität darstellbar.

Die untersuchten **Analdrüsenkarzinome** reagierten mit AE1, CAM 5.2, LP34, Ks 18.04 und Ks 19.1 folgendermaßen:

Reaktivität	AE1	CAM52	LP34	Ks1804	Ks19,1
[4+]	1	2	4	0	3
[3+]	5	6	3	3	6
[2+]	2	0	3	4	1
negativ	2	2	0	3	0
Summe	10	10	10	10	10

Zusammenfassend stellt sich das qualitative Färbemuster der eingesetzten Antikörper wie in Tabelle 4.3.2-2 aufgeführt dar.

Diskussion

In etlichen Untersuchungen konnte prinzipiell gezeigt werden, daß Antikörper gegen humane Zytokeratine auch beim Hund eingesetzt werden können (z.B.: Andreasen, Mahaffey, and Duncan 1988; Cardona et al. 1989; Rabanal et al. 1989). Dabei wurden allerdings zumeist Breitspektrumantikörper und weniger Antikörper gegen einzelne Zytokeratine oder Zytokeratinpaare eingesetzt.

In dieser Untersuchung konnte mit mehreren zum Teil sich in ihrer Spezifität überlappenden kommerziellen Antikörper gezeigt werden, daß ein Zytokeratin-Typing möglich ist (siehe Tabelle 4.3.2-2). Durch die sich ergänzenden Reaktivitäten von LP 34 (CK 6/18), CAM 5.2. (CK 8/18) und Ks18.04 (CK 18) zeigte sich, daß LP34 beim Hund außer bei Schweißdrüsen und deren Neoplasien, wo

Tabelle 4.3.2-2
 Immunhistochemische Reaktivität der eingesetzten Antikörper mit den untersuchten Hauttumoren

	AE1	AE3	KL1	CAM 5.2	LP 34	Ks 7.18	DE-K10	AE8	LL002	E3	Ks 18.04	Ks 19.1	CK20
Basaliom	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Plattenepithelkarzinom	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Intrak. verhorn. Epit.	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Papillom	+ ²	+ ³	+	-	+ ³	-	-	-	+ ¹	-	-	-	-
Hyperplasie	+ ²	+ ³	+ ²	-	+ ³	-	-	-	+ ¹	-	-	-	-
Trichoepitheliom*	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Trichoepitheliom**	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pilomatrixoma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Talgdr.-Adenom	+ ^c	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Talgdr.-Karzinom	+ ^c	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Schweißdr.-Adenom	+ ⁵	-	-	+ ⁵	+ ⁴	-	-	-	+	-	+	+	-
Schweißdr.-Karzinom	+	-	-	+ ⁵	+ ⁴	-	-	-	-	-	+	+	-
Adenom & Karzinom	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Hepatoider Drüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Analdrüsen-Karzinom	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-

* basaloide Variante

** Haarmatrixvariante

¹ basal, ² suprabasal, ³ basal u. suprabasal

⁴ äußere Zellige; ⁵ innere Zellige

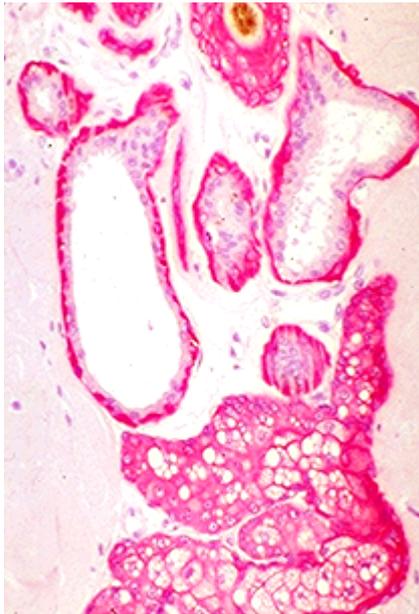


Abbildung 4.3.2-1

Adnexale Strukturen der Dermis: Hyperplastische Talgdrüsen und Schweißdrüsen. LP 34, APAAP

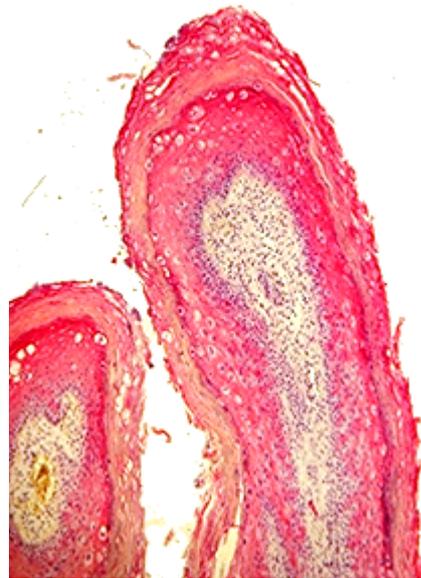


Abbildung 4.3.2-2

Papillom: Alle epithelialen Anteile reagieren mit LP 34, APAAP



Abbildung 4.3.2-3

Basaliom: Deutliche Immunreaktion der aller Tumorzellen. LL002, APAAP

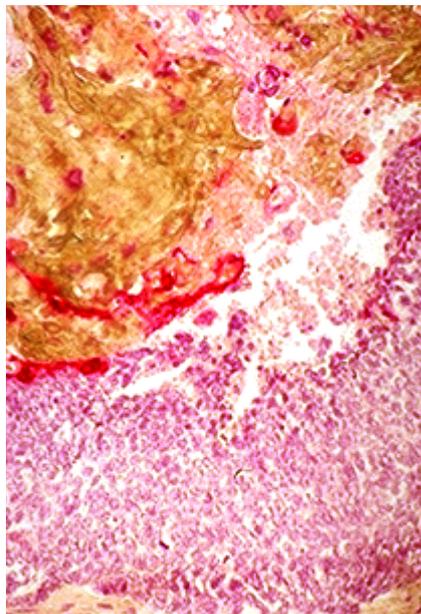


Abbildung 4.3.2-4

Pilomatrixom: Bis auf Zystenanteile keine Immunreaktivität. LP 34, APAAP

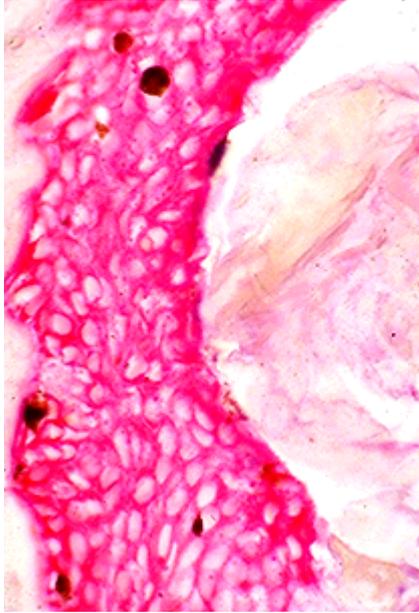


Abbildung 4.3.2-5
Trichoeplitheliom: Basaloide Variante.
LP 34, APAAP

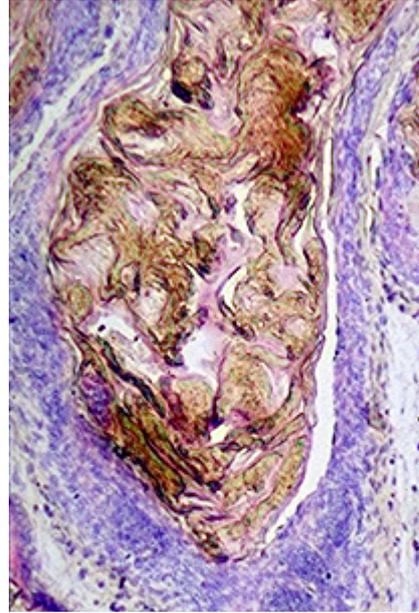


Abbildung 4.3.2-6
Trichoeplitheliom: Haarmatrix-Variante.
LP 34, APAAP

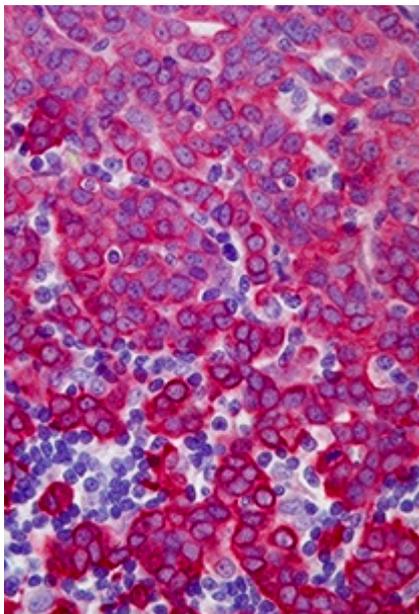


Abbildung 4.3.2-7
Schweißdrüsenkarzinom: Reaktivität
mit Ks 19.1, APAAP

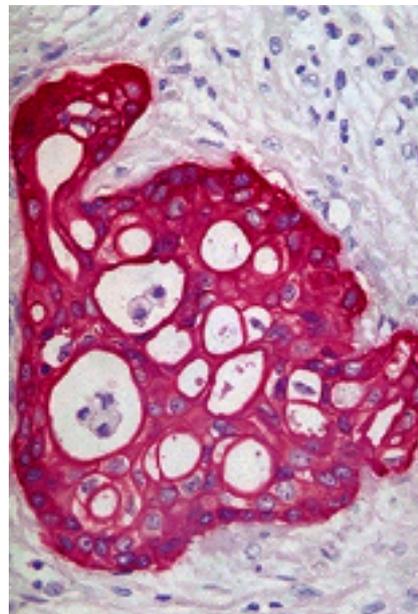
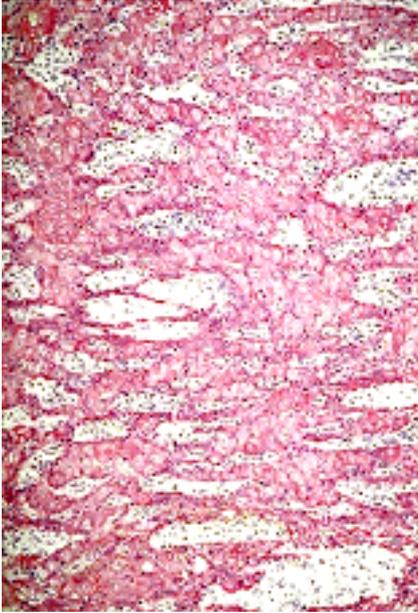
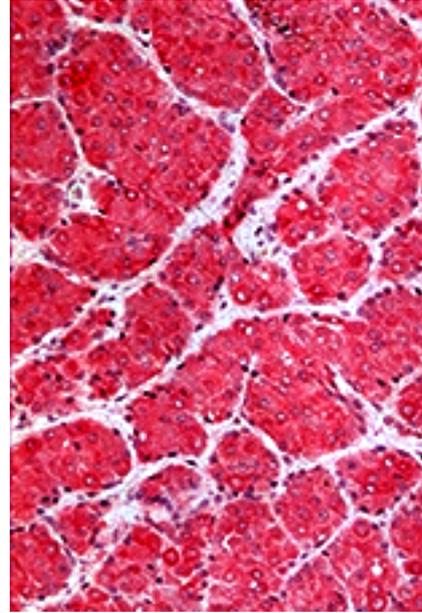


Abbildung 4.3.2-8
Schweißdrüsenkarzinom: Reaktivität
mit LP 34, APAAP

**Abbildung 4.3.2-9**

Talgdrüsenadenom: Reaktivität mit LP 34, APAAP

**Abbildung 4.3.2-10**

Adenom hepatoider Drüsen: Reaktivität mit LP 34, APAAP

auch die CK 18-Komponente des Antikörpers mitreagierte, nur CK 6 erkannte. LP 34 erwies sich zudem als „Panmarker“ für die Epidermis und deren Adnexen; außer Haarmatrixzellen und bei den Trichoepitheliomen, die der Haarmatrix entstammen, werden alle epithelialen Strukturen von LP 34 gefärbt.

Das typische Reaktionsmuster der Basaliome (AE1 negativ und LL002 positiv), das allerdings auch in der Haarmatrix und bei Trichoepitheliomen gefunden wurde, unterstützt die Vermutung, daß die Basalzellen dem Haarfollikel-epithel abstammen (Akiyama et al. 1995; Cotsarelis, Sun, and Lavker 1990; Polakowska 1994; Yang, Lavker, and Sun 1993). CK 17, das beim Menschen biochemisch aus Zellen der Haarmatrix und aus Basaliomen isoliert werden konnte (Moll et al. 1982b), läßt sich in Geweben des Menschen immunhistochemisch auch nur im Haarfollikel-epithel und in Basaliomen nachweisen; nicht jedoch in den Basalzellen der intakten Epidermis (Markey et al. 1992). Leider reagiert der von uns eingesetzte Antikörper gegen CK 17 (E3) nicht beim Hund.

Hyperplasien der Epidermis betreffen ebenso wie Papillome in der Regel basale und suprabasale Keratinozyten und weisen daher auch die typischen Zytokeratine dieser Zellen auf: CK6, CK 10 und CK 14.

Plattenepithelkarzinome exprimieren entsprechend ihrer Herkunft kein CK 14, aber CK 6 und CK 10. Bis auf CK 6 entspricht dies der Reaktivität beim Menschen (Moll et al. 1982a).

Die Zytokeratine 8 und 18 als Basiszytokeratine von Drüsen- und Gangepithelien ließen sich mittels des Antikörpers CAM 5.2. nur in Schweißdrüsen, deren Ausführungsgängen sowie in davon abstammenden Neoplasien nachweisen. Der Doppelreihigkeit von Zellen, die bei manchen Schweißdrüsentumoren (v.a. bei Spiradenomen) beobachtet werden kann, liegt wahrscheinlich eine differenzierte Entwicklung der Tumorzellen zugrunde: Die äußere Zelllage läßt sich auf Grund ihrer LP34-Reaktivität und CAM5.2-Negativität auf das Myoepithel zurückführen, während die innere Zellage (CAM 5.2. und AE1-positiv) sich aus Drüsenepithelien entwickel. Der Antikörper Ks 19.1 ist zusammen mit CAM 5.2 als sicherer Marker für drüsige Differenzierung anzusprechen.

Die Situation bei den vom Haarapparat ausgehenden Neoplasien ist etwas komplizierter: Haarmatrixzellen waren mit keinem der eingesetzten Antikörper immunreaktiv; im Falle der Trichoepitheliome liegen möglicherweise zwei Varianten vor. Eine eher *basaloid* sich differenzierende Variante, deren Tumorzellen mit LLOO2 und LP34 färbten, und eine *Haarmatrixvariante*, deren Basalzellen mit den eingesetzten Antikörpern nicht anfärbbar war und somit eher der äußeren Wurzelscheide entsprechen. Eine solche Differenzierung dürfte allerdings im „diagnostischen Alltag“ unwesentlich sein, da Trichoepitheliome in der Regel keine hohen „diagnostischen Ansprüche“ stellen, obwohl über bösartige Varianten berichtet wird (Scott and Anderson 1991; Sells and Conroy 1976).

Insgesamt zeigte sich, daß ein Tumor-Typing beim Hund prinzipiell möglich ist; jedoch reagierten etliche Neoplasien immunhistochemisch gleichartig (Tabelle 4.3.2.-2), so daß auch weiterhin die routinemäßige HE-Färbung an erster Stellen stehen sollte. In Zweifelsfällen allerdings, kann die zusätzliche immunhistochemische Färbung Klarheit ergeben.

Literatur

- Akiyama, M., B. A. Dale, T. T. Sun, and K. A. Holbrook. 1995. Characterization of hair follicle bulge in human fetal skin: the human fetal bulge is a pool of undifferentiated keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 105:844-850.
- Andreasen, C.B., E.A. Mahaffey, and J.R. Duncan. 1988. Intermediate filament staining in the cytologic and histologic diagnosis of canine skin and soft tissue tumors. *Veterinary Pathology* 25:343-349.
- Cardona, A., B.R. Madewell, D.K. Naydan, and J.K. Lund. 1989. A comparison of six monoclonal antibodies for detection of cytokeratins in normal and neoplastic canine tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1:316-323.

- Cordell, J.L., B. Falini, W.N. Erber, A.K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K.A.F. Pulford, H. Stein, and D.Y. Mason. 1984. Immunoencymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32:219 - 229.
- Cotsarelis, G., T. Sun, and R.M. Lavker. 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61:1329-1337.
- Dorn, C. R., D. O. Taylor, L. E. Chaulk, and H. H. Hibbard. 1966. The prevalence of spontaneous neoplasms in a defined canine population. *American Journal of Public Health* 56:254-65.
- Dorn, C.R., O.N. Taylor, F.L. Frye, and H.H. Hibbard. 1968a. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *Journal of the National Cancer Institute* 40:295 - 305.
- Dorn, C.R., O.N. Taylor, R. Schneider, H.H. Hibbard, and M.R. Klauber. 1968b. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* 40:307 - 318.
- MacVean, D.W., A.W. Monlux, P.S. Anderson, S.L. Silberg, and J.F. Roszel. 1978. Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology* 15:700 - 715.
- Markey, A.C., E.B. Lane, D.M. MacDonalds, and I.M. Leigh. 1992. Keratin expression in basal cell carcinomas. *British Journal of Dermatology* 126:154-160.
- Moll, Roland. 1993. *Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren*. Edited by G. Seifert. Vol. 142, Veröffentlichungen aus der Pathology (Progress in Pathology). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982a. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia tumors and cultured cells. *Cell* 31:11 - 24.
- Moll, R., W.W. Franke, B. Volc-Platzer, and R. Krepler. 1982b. Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *Journal of Cell Biology* 95:285 - 295.
- Polakowska, RR; Piacentini-M; Bartlett-R; Goldsmith-LA; Haake-AR. 1994. Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Development Dynamics* 199:176-188.
- Rabanal, R.H., D. Fondevila, V. Montane, M. Domingo, and L. Ferrer. 1989. Immunocytochemical diagnosis of skin tumours of the dog with special reference to undifferentiated types. *Research in Veterinary Science* 47:129 - 133.
- Strafuss, A.C. 1985. Skin tumors. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 15:473-492.

- Weiss, E., and K. Frese. 1974. VII. Tumours of the skin. *Bulletin of the World Health Organization* 50:79-100.
- Weiss, E., K. Frese, and R. Rudolph. 1977. Klassifikation und Nomenklatur der Hauttumoren bei Haussäugetieren. *Tierärztliche Umschau* 7:361-367.
- Yang, J.S., R.M. Lavker, and T.T. Sun. 1993. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential. *Journal of Investigative Dermatology* 101:652-659.

4.3.3 Epitheliale Neoplasien des Hundes von Haut, kutaner Schleimhaut und Übergangsepithel:

Eine Immunlokalisierungsstudie von Papillomavirus-Antigen

Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden bereits veröffentlicht. Nachfolgend das Reprint aus *Journal of Veterinary Medicine A 44: 115-123 (1997)*.

J. Vet. Med. A **44**, 115–123 (1997)
© 1997 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
ISSN 0931–184X

Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin, Germany

Epithelial Neoplasms of the Skin, the Cutaneous Mucosa and the Transitional Epithelium in Dogs: An Immunolocalization Study for Papillomavirus Antigen

K. SCHWEGLER, J. H. WALTER and R. RUDOLPH

Address of authors: Institut für Veterinär-Pathologie, Freie Universität Berlin, Strasse 518 Nr. 15,
D-14163 Berlin, Germany

With 4 figures and 2 tables

(Received for publication May 4, 1996)

Summary

In order to study the prevalence of papillomavirus antigen in canine epithelial neoplasms, 535 neoplastic and hyperplastic specimens of the skin, the cutaneous mucosa and the transitional epithelium were immunohistochemically stained with a polyclonal antiserum against papillomavirus antigen. A positive staining result occurred in 44.2% in a total of 95 papillomas and in 27% of 100 diagnosed squamous cell carcinomas, other tumours did not react with the applied antiserum. Papillomavirus antigen was detectable in 54.2% of all oral and ocular papillomas and in 37.0% of all cutaneous papillomas. The majority of the squamous cell carcinomas with detectable papillomavirus antigen were considered positive but not without restrictions. The average age of dogs with viral oral and ocular papillomas was 2.3 years, with viral cutaneous papillomas it was 3.2 years. The average age of dogs with virus-positive squamous cell carcinomas was nearly 11 years. Papillomavirus-like particles were demonstrated by means of transmission electron microscopy in three positive oral papillomas, in the positive squamous cell carcinomas virion detection failed.

Introduction

Papillomas of the dog are considered as benign neoplasms, regressing spontaneously after several weeks (CHAMBERS and EVANS, 1959). According to their localization there are three types of papillomas: a) the oral and ocular, b) the cutaneous and c) the venereal papillomatosis. Papillomavirus was demonstrated in some of the papillomas either ultrastructurally by means of electron microscopy or immunohistochemically with antisera against papillomavirus antigen (CHEVILLE and OLSON, 1964; WATRACH, 1969; DAVIS et al., 1976; BONNEY et al., 1980; JENSON et al., 1980; PFISTER and MESZAROS, 1980; SUNDBERG et al., 1984; CAMPBELL et al., 1988; SIRONI et al., 1990; SUNDBERG et al., 1991; SHIMADA et al., 1993).

The genera papovavirus A and B (MELNICK et al., 1974), respectively papilloma- and polyomaviruses (FENNER, 1976; MATTHEWS, 1982), are members of the Papovaviridae. Papillomaviruses are host specific (MELNICK et al., 1974; LANCASTER and OLSON, 1982; BREITBURD, 1987; SUNDBERG, 1987) and dermato- resp. epitheliotropic, infecting the skin and mucosal membranes (MELNICK et al., 1974; DANOS et al., 1984; BREITBURD, 1987). In contrast to their host specificity, chemically disrupted papillomavirus particles can be used to produce heterologous cross-reacting antisera, probably due to at least one internal common antigenic determinant which is probably a genus-specific antigen (ORTH et al., 1978; JENSON et al., 1980; PFISTER and MESZAROS, 1980; LIM et al., 1990).

Human papillomavirus (HPV) seems to promote malignant transformation (ORTH et al.,

SCHWEGLER, WALTER and RUDOLPH

1980; LÖNING et al., 1985; DE VILLIERS, 1989; CHANG et al., 1992). Canine papillomavirus (CPV) is also suspected of playing a role in carcinogenesis: WATRACH et al. (1970) report a squamous cell carcinoma adjacent to extensive and progressive oral papillomas (WATRACH et al., 1969) in the mouth of a 1.5 year old dog. BELKIN (1979) describes a carcinoma in situ bordering an ocular papilloma in a 5-month-old Collie puppy. In addition papillomavirus antigen was detected in a spontaneous squamous cell carcinoma affecting the vulva of a bitch (SUNDBERG et al., 1984) and also in cutaneous squamous cell carcinomas, developing in kennel dogs at the injection site of a live vaccine of canine oral papillomavirus (SUNDBERG et al., 1984; SUNDBERG et al., 1985; BREGMAN et al., 1987).

The present study was performed in 410 benign and 125 malignant canine epithelial tumours classified according to the recommendations of the WHO (BEVERIDGE and SOBIN, 1974, 1976) using a commercial antiserum against genus-specific structural papillomavirus antigens to reveal the role of papillomaviruses in canine carcinogenesis.

Material and Methods

Five hundred and thirty-five samples of epithelial lesions were selected out of 2242 formalin-fixed and paraffin-embedded canine epithelial biopsies, submitted to the Institute of Veterinary Pathology of the Free University of Berlin between January 1, 1981 and December 31, 1990. The samples were reclassified and immunohistochemically labelled with a modified alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) technique (CORDELL et al., 1984), in brief: 3–5 μm thick sections were mounted on adhesive glass slides ("Histosafe", Camon, Nr. 4000), deparaffinized, rehydrated and incubated for 30 min at room temperature in a moist chamber with a 1:800 diluted polyclonal rabbit antiovine papillomavirus antiserum (Dako, B 580). The next step was to apply a polyclonal mouse antirabbit serum (1:200) covering the antigenic determinants of the primary antibody. This step is necessary to provide a binding-place for the polyclonal rabbit antimouse serum (1:40) which finally bridges the monoclonal mouse alkaline-phosphatase-complex (1:40) (Dianova, 211-005-109, M 800). After each incubation the specimens were rinsed in tris-buffered saline pH 7.4–7.6 (TBS). An occurring reaction was visualized with substrate (naphthol-AS-MX-phosphate dissolved in N,N-dimethylformamide containing 1 M levamisol)-Fast-Red solution. Levamisol was added to block endogenous alkaline phosphatase (CORDELL et al., 1984). The sections were counterstained with haemalaun and covered with Kaisers' glycerine-gelatine. In every series two sections with verified papillomavirus antigen were processed along, one as a positive control and the other as a negative control with substituted primary antiserum. Human condyloma with PCR-confirmed papillomavirus* and a bovine fibropapilloma were used in preliminary tests to verify the specificity of the primary antiserum.

Small pieces from three paraffin-embedded papillomas and two squamous cell carcinomas which stained positive for papillomavirus antigen were deparaffinized, rehydrated through graded alcohols, post-fixed in 1% osmium tetroxide and routinely processed for transmission electron microscopy, embedding the specimens in Araldite.

Results

The results of immunohistochemistry are summarized in Table 1. Papillomavirus antigen was detectable in 42 papillomas and 10 squamous cell carcinomas (positive), the staining result in 17 squamous cell carcinomas was considered positive but not without restrictions (questionable), in 466 tumours papillomavirus antigen could not be demonstrated (negative).

Immunohistochemistry

In papillomas, papillomavirus antigen was observed preponderantly in the epithelium of apical tumour-parts and over the top of papillary fronds, where most of the proliferation and keratinization takes place. Virus antigen was not visible in the stratum basale. Papillomavirus antigen was detectable only in a few nuclei of the upper stratum spinosum, whereas the majority of antigen positive cells has been seen in the stratum granulosum and corneum (Fig. 1).

*We are grateful for the friendly gift from Prof. Dr. H. Stein, Inst. of Pathology, Benjamin-Franklin-Klinikum, FU Berlin.

Epithelial Neoplasms in Dogs

Table 1. Immunohistochemical reactivity of the reclassified canine epithelial tumours

Tumour type	Immunohistochemical labelling			
	n_{total}	$n_{(+)}$ *	$n_{(-)}$ *	$n_{(+/-)}$ *
Papilloma	95	42	53	
Squamous cell carcinoma	100	10	73	17
Baso-squamous basal cell tumour	26		26	
Trichoepithelioma	41		41	
Necrotizing and calcifying epithelioma	30		30	
Intracutaneous cornifying epithelioma	50		50	
Adenoma of hepatoid glands	49		49	
Adenocarcinoma of hepatoid glands	6		6	
Sebaceous gland adenoma	26		26	
Sebaceous gland adenocarcinoma	4		4	
Sweat gland adenoma	5		5	
Sweat gland adenocarcinoma	10		10	
Transitional cell papilloma	10		10	
Transitional cell carcinoma	5		5	
Hyperplasia of squamous epithelium	60		60	
Fibrous polyp	6		6	
Epulis	12		12	
	$\Sigma_n = 535$	$\Sigma_n = 52$	$\Sigma_n = 466$	$\Sigma_n = 17$

* (+) = positive, (-) = negative, (+/-) = questionable

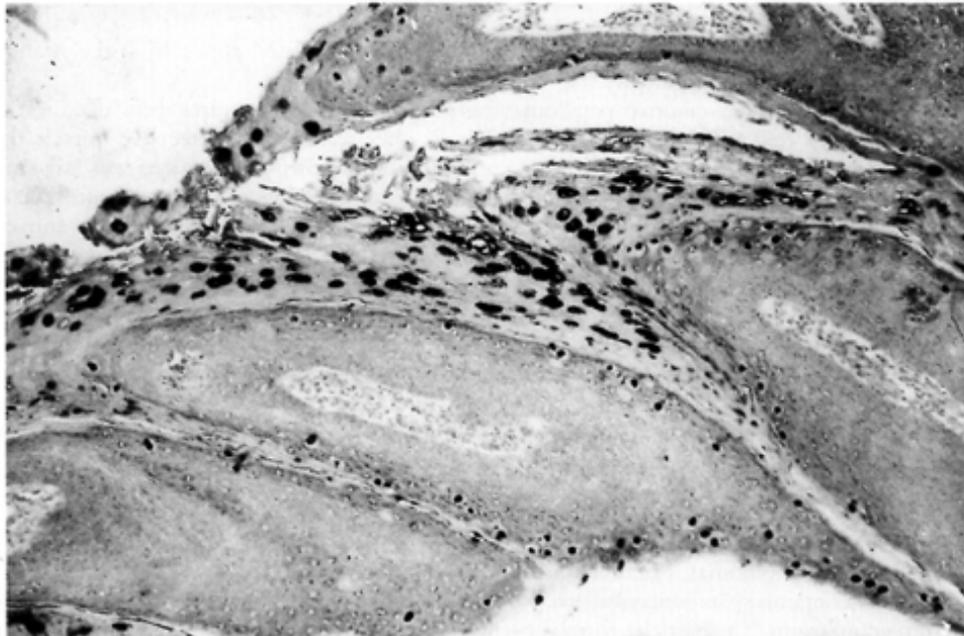


Fig. 1. Papilloma, oral mucosa, dog. Papillomavirus antigen in numerous cells of the stratum granulosum and the stratum corneum. APAAP-method, haemalaun counterstain, $\times 100$.

Frequently the positive cells in stratum spinosum and granulosum showed central nuclei and a pale, hydropic degenerating cytoplasm. Positive staining was predominantly intranuclear, in some cells virus antigen seemed to be spread over the cell matrix or to be located at the cell membrane. Corresponding to the progress of keratinization the cell structure became indistinct,

SCHWEGLER, WALTER and RUDOLPH

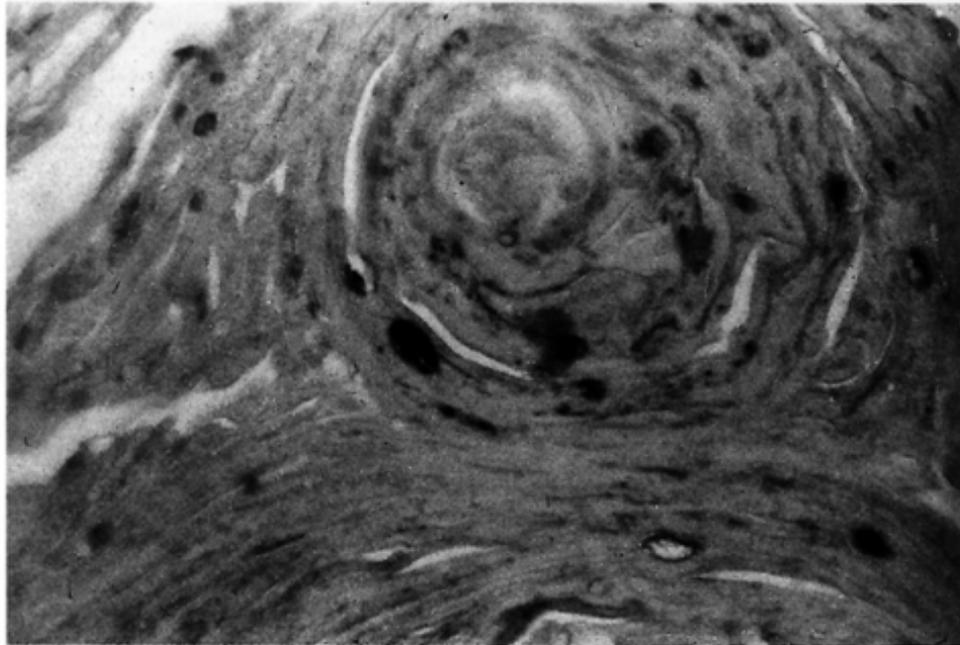


Fig. 2. Squamous cell carcinoma, toe, dog. Some cells of the horn pearls show papillomavirus antigen. APAAP-method, haemalaun counterstain, $\times 400$.

the labelled cells transformed, became longish or spindle-shaped and appeared in the stratum corneum as red ribbons or annulars (Fig. 1).

In squamous cell carcinomas papillomavirus antigen positive structures were allied to the keratinizing cells that form the 'horn pearls' (Fig. 2), they were hardly detectable outside the keratinizing centres. The intensity was fading and the number of positive nuclei was less than in the papillomas. The specific reaction was in 10 carcinomas obviously located intracellular (Fig. 2), although the cell structures were difficult to differentiate and papillomavirus antigen appeared to be often located in the cytoplasm. Seventeen neoplasms with preponderantly light labelled ribbon-like virus-positive structures in keratinized areas without visible cell-borders were considered positive but not without restrictions. Possibly these ribbon-like structures corresponded to flat virus-positive keratinocytes.

Papillomavirus antigen was not detected in 26 baso-squamous basal cell tumours, 71 hair follicle tumours, 50 intracutaneous cornifying epitheliomas, 55 tumours of the hepatoid glands, 30 sebaceous gland tumours, 15 sweat gland tumours, 15 tumours of transitional epithelium, 60 hyperplasias of squamous cell epithelium, six fibrous polyps and 12 epulides (Table 1).

Transmission electron microscopy

The three papillomas examined ultrastructurally by means of transmission electron microscopy contained papillomavirus-like particles, approximately 45–50 nm in diameter in the stratum granulosum. The particles formed pseudo-crystalline aggregates, singular particles were dispersed in the nuclear matrix or located at the nuclear membrane (Fig. 3). In the two examined squamous cell carcinomas virus-like particles could not be detected.

Localization and age distribution

Papillomas from mouth, eye and nose were summarized among oral and ocular papillomatosis, those from ears, legs and trunk were added to the cutaneous papillomatosis, whereas papillomas of vulva, vagina, penis and prepuce belonged to the venereal papillomatosis.

Epithelial Neoplasms in Dogs

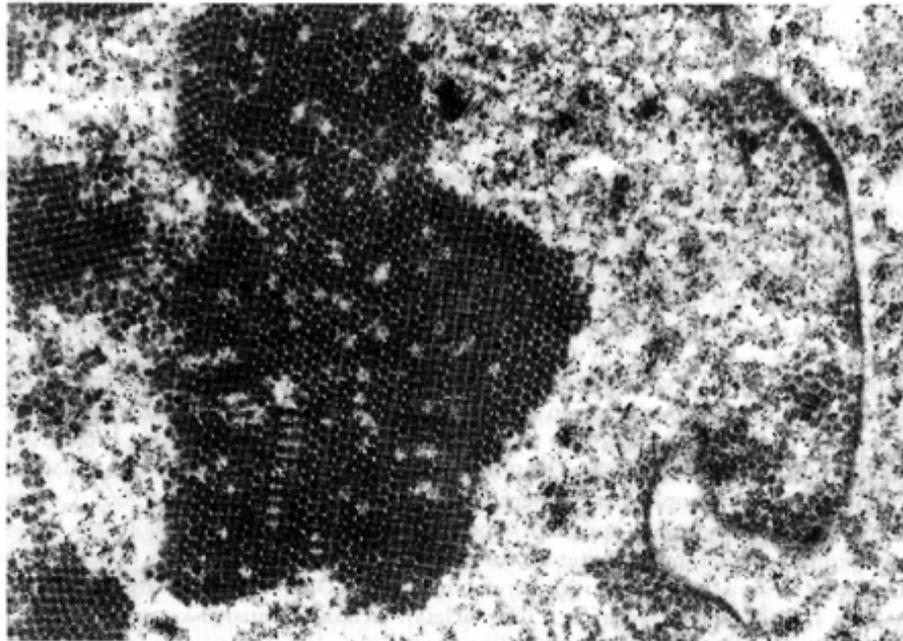


Fig. 3. Papilloma, oral mucosa, dog. Numerous aggregated virus particles in a nucleus of the stratum granulosum. Some virus particles stick to the partly degenerated nuclear membrane, uranyl acetate and lead citrate, $\times 20\,000$.

The present immunolocalization study revealed papillomavirus antigen in 54.2% ($n = 32$) of the oral and ocular papillomas ($n = 59$), in 37.0% ($n = 10$) of the cutaneous papillomas ($n = 27$) but in none of the venereal papillomas ($n = 9$). 76.2% of the infectious papillomas ($n = 32$) occurred in dogs under 3 years of age, the rest ($n = 10$) was distributed among dogs up to 9 years of age. The average age of dogs with viral oral and ocular papillomatosis was 2.3 years, of those with viral cutaneous papillomatosis it was 3.2 years. Dogs without a positive staining result had an average age between 7 and 9 years. As is shown in Fig. 4, which compares the age of dogs with and without papillomavirus antigen positive signal in papillomas,

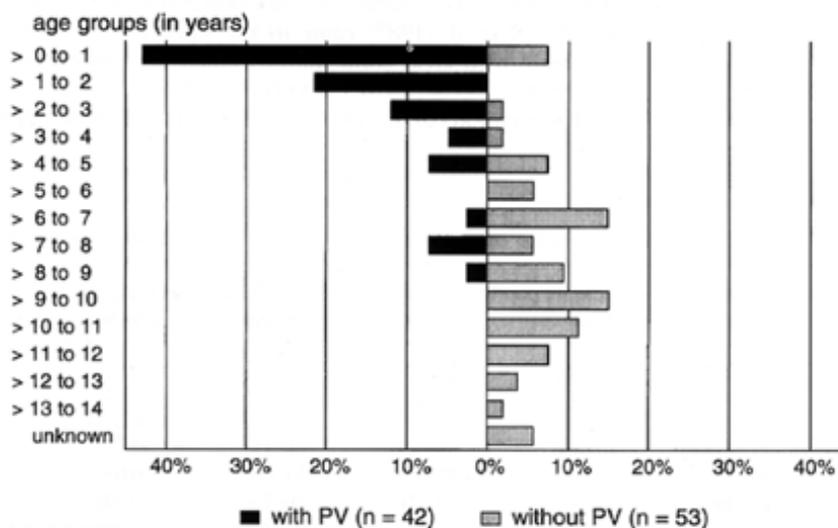


Fig. 4. Percentage of papillomavirus antigen (PV) in canine papillomas of different age-groups.

SCHWEGLER, WALTER and RUDOLPH

papillomavirus antigen was detectable in 70–100% of the papillomas in the age groups up to 4 years and in 10–50% in the age groups between 4 and 9-year-old dogs.

70.4% of the squamous cell carcinomas with detectable papillomavirus antigen were located at the toes ($n = 19$), other locations were abdomen ($n = 3$), limb ($n = 2$), oral mucosa ($n = 1$), neck ($n = 1$) and tail ($n = 1$). Most of the virus-positive squamous cell carcinomas showed a very well differentiation with lots of horn pearls ($n = 14$). The less keratinized tumours were considered as well ($n = 9$) and less ($n = 4$) differentiated, the staining result in these tumours was usually considered positive but not without restrictions. The average age of the affected dogs was nearly 11 years.

Discussion

The present study revealed that localization and distribution of papillomavirus antigen corresponded to the information given in the literature: antigen was observed in nuclei of cells in the stratum sponosum, granulosum and corneum (CHEVILLE and OLSON, 1964; JENSON et al., 1980; SUNDBERG et al., 1984; CAMPBELL et al., 1988; SIRONI et al., 1990; SHIMADA et al., 1993) and in the cytoplasm of superficial cell layers (LÖNING et al., 1986). Cutaneous papillomas generally seemed to contain less positive cells than mucosal papillomas.

According to other investigations, focal papillomavirus antigen was only observed in well differentiated areas of squamous cell carcinomas (MELLORS, 1960; LÖNING et al., 1985; LÖNING et al., 1986) restricted upon a few nuclei of well differentiated keratinocytes (SUNDBERG et al., 1984; SUNDBERG et al., 1985; BREGMAN et al., 1987). Viral antigens also occurred in the cytoplasm of carcinoma cells, as previously described (MELLORS, 1960; OSATO and ITO, 1967). Immunohistochemical staining in squamous cell carcinomas was less intense than in the papillomas. This might be due to a higher proportion of non-associated virus structural proteins (ORTH et al., 1978; DINTER, 1984), which are responsible for the immunohistochemical labelling (LANCASTER and OLSON, 1982; BREGMAN et al., 1987).

Papillomavirus antigen could not be detected in any other tumour or hyperplastic lesion. This result supports the view of other investigations (CHEVILLE and OLSON, 1964; SUNDBERG et al., 1984; BREGMAN et al., 1987; SIRONI et al., 1990). An exception is the group of SIRONI et al. (1990), who describe papillomavirus antigen in a hyperplastic epidermal lesion, which might be considered as an early papilloma.

Virus particles were demonstrated in all three oral papillomas examined. Comparing their size, site and formation with information available from other investigations (CHEVILLE and OLSON, 1964; WATRACH et al., 1969), they were designated as papillomavirus-like particles. In contrast to the examined papillomas, virus-like particles were not observed in the two examined squamous cell carcinomas. BREGMAN et al. (1987) came to the same results. Only in the epithelium near the malignant transformed areas some authors could demonstrate virus-like particles (WATRACH et al., 1970; JARRETT et al., 1978; CHANG et al., 1992). The results of this study are comparable to those of SUNDBERG et al. (1984) and SIRONI et al. (1990) (Table 2).

Table 2. Localization and frequency of papillomas with detectable papillomavirus antigen

Papillomas with detectable papillomavirus antigen in different sites ($n_{\text{pos}}/n_{\text{site}}$)					
	Total	Oral	Cutaneous	Ocular	Venereal
44.2% ¹ (42/95)	66.0% (31/47)	37.0% (10/27)	8.3% (1/12)	0.0% (0/9)	
38.2% ² (21/55)	50.0% (7/14)	47.4% (9/19)	26.7% (4/15)	14.3% (1/7)	
61.1% ³ (11/18)	75.0% (6/8)	57.1% (4/7)	33.3% (1/3)	0.0% (0/0)	

¹ This study; ² SUNDBERG et al. (1984); ³ SIRONI et al. (1990).

Epithelial Neoplasms in Dogs

Concerning the influence of location upon papillomas with detectable papillomavirus antigen, oral papillomas came first, followed by cutaneous and ocular, and finally venereal papillomas.

The dominating localization of papillomavirus positive papillomas might be due to several reasons. Perhaps the reproduction rate of papillomaviruses differs depending on the tissues infected. Transmission experiments revealed a different susceptibility of canine tissues (TOKITA and KONISHI, 1975). The exposure and sensitivity of tissues might be important too. Perhaps the oral mucosa is more easily infected with a higher infective dose than the skin because it sustains more frequent mechanical injury. Furthermore, mutual licking is an important social component, especially for puppies and young dogs, and promotes the transmission of papillomavirus. DAVIS et al. (1976) suspected that minor trauma to the skin of the feet in the racing greyhound is an important factor in the establishment of papillomavirus infection. The rare occurrence of viral ocular papillomas could be explained by the good protection of the eye ball and its mucosa. Pet dogs have a low risk for genital contact infection and this might be a reason for the small number of venereal papillomas. The results could also implicate the existence of several types of CPV. PFISTER and MESZAROS (1980), SUNDBERG (1987) and CAMPBELL et al. (1988) suppose that CPV analogous to HPV infects different tissues. But the relationship of papillomaviruses infecting different canine tissues is still under discussion (TOKITA and KONISHI, 1975; BONNEY et al., 1980; PFISTER and MESZAROS, 1980; SUNDBERG, 1987).

Most of the squamous cell carcinomas with and without demonstrable papillomavirus antigen originated from the toes. In addition, squamous cell carcinomas of the digits were usually well differentiated (SCHWEGLER, 1994). This supports the assumption of LÖNING et al. (1986) and BREGMAN et al. (1987) that the presence of virions and structural antigen depends on the degree of differentiation, especially on the quantity of keratin production, the latter playing a more important role than the dignity of the neoplasm. Limbs and toes are also expected to be a preferred site for papillomas (DAVIS et al., 1976; SCHWEGLER, 1994). This relation between papillomas and squamous cell carcinomas might implicate a co-carcinogenic relevance for papillomavirus infections. The role of papillomavirus infection in multifactorial cancerogenesis is discussed (ZUR HAUSEN, 1977; JARRETT et al., 1978; DINTER, 1984; LUTZNER et al., 1984; BREGMAN et al., 1987; CAMPO, 1992). Some authors reported on malignant transformation in the course of canine papillomatosis and papillomavirus infection (WATRACH et al., 1970; BELKIN, 1979; SUNDBERG et al., 1984; SUNDBERG et al., 1985; BREGMAN et al., 1987). The conclusion is, according to BREGMAN et al. (1987), that CPV might induce a greater spectrum of neoplasms than we know.

In the present study the majority of virus-positive papillomas occurred in young dogs, but they were also frequent in older dogs. This explains the higher average age in our study compared to the literature, where the age of dogs with oral and ocular papillomas is between 6 weeks and 2 years (WATRACH et al., 1969; CHEVILLE and OLSON, 1964; BELKIN, 1979; BONNEY et al., 1980) with an average age of one year (HEAD, 1990), and of dogs with viral cutaneous papillomas it is stated between 8 months and 3 years (WATRACH, 1969; DAVIS et al., 1976; CAMPBELL et al., 1988), in one case 7 years (SHIMADA et al., 1993). The results of the present study suggest that infectious papillomatosis is not only related to young dogs, as is often suspected, but also plays an important role in older dogs. Furthermore, papillomavirus antigen was more frequently detected in cutaneous papillomas than is described in the literature. The detection of papillomavirus antigen in squamous cell carcinomas verifies and completes the results of SUNDBERG et al. (1984) and BREGMAN et al. (1987). Questions concerning the involvement of papillomaviruses with other neoplastic diseases of dogs as well as the existence of several types of CPV are raised.

The importance of papillomaviruses for tumourgenesis in dogs cannot be finally proven with this study. Neoplasms without detectable papillomavirus antigen are not automatically without virus. It might be that papillomavirus has vanished or remains only in small amounts or in a non-demonstrable form present in the infected cells. The investigation of SCHADENDORF et al. (1991) implies that papillomavirus is not always demonstrable with immunohistochemistry.

Consequently, further studies should be directed to sequence the CPV-DNA and establish molecular methods to learn more about the oncogenic potential of this virus.

SCHWEGLER, WALTER and RUDOLPH

References

- BELKIN, P. V., 1979: Ocular lesions in canine oral papillomatosis (a case report). *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **74**, 1520–1527.
- BEVERIDGE, W. I. B., and L. H. SOBIN, 1974: International classification of tumours of domestic animals. *Bull. World Health Organ.* **50**, 1–142.
- BEVERIDGE, W. I. B., and L. H. SOBIN, 1976: International classification of tumours of domestic animals—Part 2. *Bull. World Health Organ.* **53**, 137–304.
- BONNEY, C. H., S. A. KOCH, A. W. CONFER, and P. F. DICE, 1980: A case report: A conjunctivocorneal papilloma with evidence of a viral etiology. *J. Small Anim. Pract.* **21**, 183–188.
- BREGMAN, C. L., R. S. HIRTH, J. P. SUNDBERG, and E. F. CHRISTENSEN, 1987: Cutaneous neoplasms in dogs associated with canine oral papillomavirus vaccine. *Vet. Pathol.* **24**, 477–487.
- BREITBURD, F. V., 1987: Cell culture systems for the study of papillomaviruses. In: SYRJÄNEN, K., L. GISSMANN and L. G. KOSS (eds) *Papillomaviruses and human disease*, pp. 371–392. Springer-Verlag, Berlin.
- CAMPBELL, K. L., J. P. SUNDBERG, M. H. GOLDSCHMIDT, C. KNUPP, and M. E. REICHMANN, 1988: Cutaneous inverted papillomas in dogs. *Vet. Pathol.* **25**, 67–71.
- CAMPO, M. S., 1992: Cell transformation by animal papillomavirus. *J. Gen. Virol.* **73**, 217–222.
- CHAMBERS, V. C., and C. A. EVANS, 1959: Canine oral papillomatosis. I. Virus assay and observation on the various stages of the experimental infection. *Cancer Res.* **19**, 1188–1195.
- CHANG, F., S. SYRJÄNEN, Q. SHEN, L. WANG, D. WANG, and K. SYRJÄNEN, 1992: Human papillomavirus involvement in esophageal precancerous lesions and squamous cell carcinomas as evidenced by microscopy and different DNA techniques. *Scand. J. Gastroenterol.* **27**, 553–563.
- CHEVILLE, N. F., and C. OLSON, 1964: Cytology of the canine oral papilloma. *Am. J. Pathol.* **45**, 849–872.
- CORDELL, J. L., B. FALINI, W. N. ERBER, A. K. GHOSH, Z. ABDUL-LAZIZ, S. MACDONALD, K. A. F. PULFORD, H. STEIN, and D. Y. MASON, 1984: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* **32**, 219–229.
- DANOS, O., I. GIRI, F. THIERRY, and M. YANIV, 1984: Papillomavirus genomes: sequences and consequences. *J. Invest. Dermatol. Suppl.* **83**, 7s–11s.
- DAVIS, P. E., C. R. R. HUXTABLE, and M. SABINE, 1976: Dermal papillomas in the racing greyhound. *Australasian J. Dermatol.* **17**, 13–16.
- DE VILLIERS, E.-M., 1989: Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J. Virol.* **63**, 4898–4903.
- DINTER, Z., 1984: EMBO workshop on papillomaviruses. *Zentralbl. Veterinärmed. B* **31**, 550–551.
- FENNER, F., 1976: Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of viruses. *Intervirology* **7**, 1–115.
- HEAD, K. W., 1990: Tumors of the alimentary tract. In: MOULTON, J. E. (ed.) *Tumors in domestic animals*, 3rd edn, pp. 347–437. University of California Press, Berkeley.
- JARRETT, W. F. H., E. MCNEIL, W. T. R. GRIMSHAW, I. E. SELMAN, and W. I. H. MCINTYRE, 1978: High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus. *Nature* **274**, 215–217.
- JENSON, A. B., J. D. ROSENTHAL, C. OLSON, F. PASS, W. D. LANCASTER, and K. SHAH, 1980: Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species. *J. Natl. Cancer. Inst.* **64**, 495–500.
- LANCASTER, W. D., and C. OLSON, 1982: Animal papillomaviruses. *Microbiol. Rev.* **46**, 191–207.
- LIM, P. S., A. B. JENSON, L. COWSERT, Y. NAKAI, L. Y. LIM, X. W. JIN, and J. P. SUNDBERG, 1990: Distribution and specific identification of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* **162**, 1263–1269.
- LÖNING, T., H. IKENBERG, J. BECKER, L. GISSMANN, I. HOEPFNER, and H. ZUR HAUSEN, 1985: Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J. Invest. Dermatol.* **84**, 417–420.
- LÖNING, T., I. HOEPFNER, and K. MILDE, 1986: Zur Typisierung von Schleimhautpapillomen und -carcinomen. *Pathologie* **7**, 187–191.
- LUTZNER, M. A., C. BLANCHET-BARDON, and G. ORTH, 1984: Clinical observations, virologic studies, and treatment trials in patients with epidermodysplasia verruciformis, a disease induced by specific human papillomaviruses. *J. Invest. Dermatol. Suppl.* **83**, 18s–25s.
- MATTHEWS, R. E. F., 1982: Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. *Intervirology* **17**, 1–199.
- MELLORS, R. C., 1960: Tumor cell localization of the antigens of the Shope papilloma virus and the Rous sarcoma virus. *Cancer Res.* **20**, 744–755.

Epithelial Neoplasms in Dogs

- MELNICK, J. L., A. C. ALLISON, J. S. BUTEL, W. ECKHART, B. E. EDDY, S. KIT, A. J. LEVINE, J. A. R. MILES, J. S. PAGANO, L. SACHS, and V. VONKA, 1974: Papovaviridae. *Intervirology* **3**, 106–120.
- ORTH, G., F. BREITBURD, and M. FAVRE, 1978: Evidence for antigenic determinants shared by the structural polypeptides of (Shope) rabbit papillomavirus and human papillomavirus type 1. *Virology* **91**, 243–255.
- ORTH, G., M. FAVRE, F. BREITBURD, O. CROISSANT, S. JABLONSKA, S. OBALEK, M. JARZABEK-CHORZELSKA, and G. RZESA, 1980: Epidermodysplasia verruciformis: A model for the role of papilloma viruses in human cancer. *Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation* **7**, 259–281.
- OSATO, T., and Y. ITO, 1967: In vitro cultivation and immunofluorescence studies of transplantable carcinomas V × 2 and V × 7. *J. Exp. Med.* **126**, 881–886.
- PFISTER, H., 1987: Papillomaviruses: General description, taxonomy, and classification. In: SALZMAN, N. P. and P. M. HOWLEY (eds) *The Papovaviridae*, Volume 2, pp. 1–38. Plenum Press, New York and London.
- PFISTER, H., and J. MESZAROS, 1980: Partial characterization of a canine oral papillomavirus. *Virology* **104**, 243–246.
- SCHADENDORF, D., K.-H. TIEDEMANN, N. HAAS, and B. M. CZARNETZKI, 1991: Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded condylomata acuminata—comparison of immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 549–554.
- SCHWEGLER, K., 1994: Epitheliale Tumoren des Hundes von Haut, kutaner Schleimhaut und Übergangsepithel: Histologische Klassifikation, Untersuchung auf Papillomavirus-Antigen und Ermittlung von Tumorfrequenzen sowie Prävalenzen der Tumorträger. *Vet. Diss. Berlin*.
- SHIMADA, A., K. SHINYA, T. AWAKURA, I. NARAMA, H. MAEDA, and T. UMEMURA, 1993: Cutaneous papillomatosis associated with papillomavirus infection in a dog. *J. Comp. Pathol.* **108**, 103–107.
- SIRONI, G., M. CANIATTI, and E. SCANZIANI, 1990: Immunohistochemical detection of papillomavirus structural antigens in animal hyperplastic and neoplastic epithelial lesions. *J. Vet. Med. A* **37**, 760–770.
- SUNDBERG, J. P., 1987: papillomavirus infections in animals. In: SYRJÄNEN, K., L. GISSMANN and L. G. KOSS (eds) *Papillomaviruses and human disease*, pp. 40–103. Springer-Verlag, Berlin.
- SUNDBERG, J. P., R. E. JUNGE, and W. D. LANCASTER, 1984: Immunoperoxidase localization of papillomaviruses in hyperplastic and neoplastic epithelial lesions of animals. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 1441–1446.
- SUNDBERG, J. P., E. SCHMIDT, M. K. O'BANION, and C. OLSON, 1985: Squamous cell carcinoma associated with canine oral papillomavirus (abstr.). *J. Cell. Biochem. Suppl.* **9C**, 75.
- SUNDBERG, J. P., A. A. RESZKA, E. S. WILLIAMS, and M. E. REICHMANN, 1991: An oral papillomavirus that infected one coyote and three dogs. *Vet. Pathol.* **28**, 87–88.
- TOKITA, H., and S.-I. KONISHI, 1975: Studies on canine oral papillomatosis. II. Oncogenicity of canine oral papillomavirus to various tissues of dog with special reference to eye tumor. *Jpn. J. Vet. Sci.* **37**, 109–120.
- WATRACH, A. M., 1969: The ultrastructure of canine cutaneous papilloma. *Cancer Res.* **29**, 2079–2084.
- WATRACH, A. M., L. E. HANSON, and R. C. MEYER, 1969: Canine papilloma: The structural characterization of oral papilloma virus. *J. Natl. Cancer. Inst.* **43**, 453–458.
- WATRACH, A. M., E. SMALL, and M. T. CASE, 1970: Canine papilloma: Progression of oral papilloma to carcinoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* **45**, 915–920.
- ZUR HAUSEN, H., 1977: Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **78**, 1–30.

4.4 Zytokeratine der Mamma

Maligne Neoplasien der Mamma sind mit die häufigsten Todesursachen (siehe auch Kapitel 4.1) beim Hund (Albert, Benjamin, and Shukla 1994; Cotchin 1972).

Dementsprechend bedeutsam ist es, prognostische Kriterien für die Diagnostik von Mammatumoren zu erstellen. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint neben dem Nachweis eines Gefäßeinbruches (Gutberlet and Rudolph 1996), die Feststellung einer Metastasierung das diagnostische sicherste Kriterium für malignes Tumorverhalten zu sein, da der Nachweis von Hormonrezeptoren bei der Hündin nicht die in ihn gesetzte Hoffnung erfüllt hat (Hünerbein and Gutberlet 1997).

Um eine Metastase ihrem Ausgangsgewebe (hier: Mamma) eindeutig zuzuordnen zu können, müßte ein distinktes Zytokeratinmuster der Muttergeschwulst vorhanden und bekannt sein.

In Kapitel 4.4.1 wird daher – mittels Immunblot und Immunhistochemie – ein Zytokeratin-Typing von unveränderter Mamma und von Mammatumoren versucht. Als unmittelbare Konsequenz aus den dadurch gewonnen Erkenntnissen wird in Kapitel 4.4.2 versucht, mit Hilfe der Immunhistochemie, Mikrometastasen und Tumorzellemboli in Lymphknoten der Mamma zu finden.

Literatur

- Albert, R.R., S.A. Benjamin, and R. Shukla. 1994. Life span and cancer mortality in the Beagle dog and humans. *Mechanisms of Ageing and Development* 74:149-159.
- Cotchin, E. 1972. Comparative oncology. Neoplasms of interest to medical and veterinary pathologist. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* 7 (Supl.):1 - 16.
- Gutberlet, K., and R. Rudolph. 1996. Angiosis carcinomatosa bei Mammatumoren der Hündin - Häufigkeit und Verbindung mit prognostisch wichtigen Faktoren. *Kleintierpraxis* 41:473-482.
- Hünerbein, P., and K. Gutberlet. 1997. Immunhistochemische Untersuchungen zum Rezeptorprofil verschiedener caniner Mammatumoren – ein Hilfsmittel zur Prognosestellung? Paper read at 40. Tagung der Fachgruppe Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 20. Mai 1997, at Berlin

4.4.1 Biochemische und immunhistochemische Charakterisierung von Zytokeratinen in normalen und neoplastischen caninen Mammagewebe

Diese Untersuchung ist bereits im *European Journal of Veterinary Pathology* 1 (3): 105-111 (1995) veröffentlicht worden.

Biochemical and immunohistochemical characterisation of cytokeratins in normal and neoplastic canine mammary glands

J.H. Walter¹, S. Kling²

¹Institute of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, Germany

²Institute of Poultry Diseases, Freie Universität Berlin, Germany

Key words

Mammary tumors, cytokeratins, western blot, immunohistochemistry, dog.

SUMMARY

The expression of a variety of cytokeratins occurring in neoplastic and normal canine mammary glands was examined histochemically and on Western Blots. Using commercial (anti-human) monoclonal antibodies, cytokeratins 8/18, 7, 10, 13, 18 and 19 can be found with a certain regularity in normal canine mammary tissue and in canine mammary adenocarcinomas. The regular occurrence of cytokeratin 14 (MW 53.000 kD) can be shown in inactive and in proliferative myoepithelia. Thus, with these antibodies a subtyping of canine carcinomas is possible.

INTRODUCTION

Tumors of the mammary glands have been recognized as the most common neoplasia in ageing bitches^{6,12}. Data refer to the average prevalence range from 25% to 50%^{13,14,20}. Since spontaneous malignant tumors of the canine mammary glands show similar characteristics to those in humans²⁰, they can be considered as animal models for corresponding tumors in humans^{24,25}. However, the methods of classification must be standardized to allow for meaningful comparisons. The WHO classification for canine mammary tumors¹⁰ according to morphologic criteria is purely descriptive. The (histogenetic) classification for human mammary tumors²² also considers the localisation (ductile, lobal, etc.) for its evaluation.

Neither clinical nor pathological diagnoses usually pose any problems if one neglects the distinction

between myoepithelial and mesenchymal tumor cell origins (known as "mixed tumor" or "complex carcinoma")^{23,24}. Diagnosis becomes more difficult when distant metastases (of carcinomas) are to be matched with their primary tumors and when the morphology allows a variety of diagnoses. In such cases the typing of intermediate filaments, especially of cytokeratins, that are cell- or organ-specific can be helpful. Cytokeratin filaments (CK) are specific components of the epithelium. Twenty different human CK polypeptides are known. They occur in pairs and can be expressed with a strict specificity in one type of tissue^{17,18}. In addition to cytokeratins other intermediate filaments like vimentin or desmin^{5,23,27-29} or markers other than intermediate filaments like α -smooth muscle actin²⁷⁻²⁹ or S-100 protein⁷ were used to identify different cell types. The fact that the intermediate filament protein patterns of tissues are preserved in malignant transformations^{11,22} enables the determination of certain characteristics and qualities of a specific tumor. Blastomas, which are undifferentiated to a large extent, or metastases can often still be assigned to their tissue of origin, because the profile of expression of an affected cell remains relatively stable throughout all stages of its alteration, up to the point where it reaches its malignant state^{23,21}. That the latter point is also relevant in canines was demonstrated by applying immunohistochemical methods on the mammary glands^{20,21,29}.

So far, specific antibodies against canine cytokeratins are not commercially available. This means that there is still a risk of obtaining false-positive results from immunohistochemical tests. The aim of this study is to attempt to give a biochemical and immunohistochemical description of cytokeratins which occur in normal and in pathologically altered canine mammary glands.

J.H. Walter, S. König

MATERIALS AND METHODS

Tissue, both from normal canine mammary glands and from neoplastic glands was selected either immediately after operations, or during autopsy (less than 16h post mortem). The samples were divided immediately after having been received. One of the fractions was snap-frozen in Isopentan that had previously been cooled to -140°C with liquid nitrogen, and then preserved at -80°C until further use. The other fraction was fixed in 4% neutral formalin for 24–48 hours and embedded in paraffin. From this fraction, 5 μm thick sections were made, and stained in Hematoxylin & Eosin (H&E), and others were taken for immunohistochemistry on coated slides (Histosafe, Shandon). The frozen tissue was divided once more, and from one fraction serial sections, approximately 5 μm thick, were made, fixed in acetone cooled to -20°C , and air dried. Each section was stained with H&E and examined immunohistochemically. Overall, 10 non-neoplastic samples, 10 adenocarcinomas, 3 complex adenocarcinomas with noticeable proliferation of the myoepithelium and 5 solid carcinomas, all originating from mammary tissue, were chosen for further examination.

Immunohistochemistry

All non-stained serial sections were incubated with monoclonal antibodies (MAbs) against cytokeratins (Table 1) and were visualized by applying a slightly modified APAAP- technique⁶. The sections that were made from the samples which had been fixed in formalin and embedded in paraffin were incubated with monoclonal antibodies for 30 mins.

after having either been dewaxed and preheated in a microwave oven (2 x 5 mins. at 600W in 10mM citrate buffer, pH 6.0) or treated with protease (Pronase E, Sigma: 0.1% for 10 mins. at 37°C). Then, second antibodies (diluted to 1:100) and the Alkaline Anti-Alkaline Phosphatase Complex (both from Dianova) were added. The reaction was visualized with substrate-Fast Red Developer. The immunohistochemistry was carried out with the Sequenza (Shandon) staining station.

Cytokeratin extraction

The cytoskeletal fraction was extracted from the remains of the frozen material according to Achtstätter et al. (1986). Briefly, about 1 gram of material was finely chopped, resuspended in an extraction buffer (high salt, 1% Triton) using an homogenizer (NeoLab Bio Homogenizer) at 4°C and was then centrifuged with 10.000 g at 4°C for 15 mins. The resulting non-soluble protein pellet was stored at -80°C until required.

One-Dimensional SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis

The pellets were dissolved in a buffer (2.5% SDS, 10mM Tris HCl, 10% glycerol, 50 mM DTT) by heating to 95°C for 15 mins. After cooling, molecular weight markers were added and the samples were electrophoresed. The standard method of Laemmli (1970) was applied for the one-dimensional SDS (sodium dodecylsulfate) PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis). A 12.5% gel, consisting of acrylamide and bisacrylamide in a ratio of 200:1 was used.

Table 1. Monoclonal antibodies used for the APAAP procedure and the Western Blot

Antibodies	Specificity	Dilution APAAP	Dilution Western Blot	Source
AE1	CK 10, 14, 16, 19	1:400	1:1000	ICN
AE3	CK 1, 5, 8	1:400	1:1000	ICN
KL1	several CK's	1:100	1:1500	Dianova
KB.60	CK 1, 10/13	1:20	1:400	Progen
CAM 5.2	8/18	ready to use	1:10	Becton Dickinson
Ks 7.18	CK 7	1:50	1:1000	Progen
LDS-68, Anti-Cytokeratin Peptide 7	CK 7	1:200	1:2000	Sigma
m20, Anti-Cytokeratin Peptide 8*	CK 8	1:200	1:2000	Sigma
DE-K10, Dako-CK10	CK 10	1:100	1:1500	Dako
AE 8	CK 13	1:10	1:200	BioGenex
CKB1, Anti-Cytokeratin Peptide 14*	CK 14	1:200	1:2000	Sigma
E3, Dako-CK 17**	CK 17	1:20	1:400	Dako
Ks 17.E3*	CK 17	1:10	1:200	Progen
Ks 18.04	CK 18	1:20	1:400	Progen
Anti-Cytokeratin Peptide 18, CY-90	CK 18	1:800	1:3000	Sigma
Ks 19.1	CK 19	1:10	1:200	Progen
CK 20	CK 20	1:10	1:100	PD Dr. R. Moll, Mainz

* only applicable for frozen sections; ** microwave treatment.

After electrophoresis, some gels were stained with Coomassie Blue and left to destain for several hours.

Immunoblotting (Western Blot)

The separated proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane in a blotting chamber²⁶ and were visualized with an indirect method after blocking in BSA. The antibodies used were diluted up to twenty times more (Table 1) than for the APAAP method, and reactions were visualized by second antibodies conjugated to alkaline phosphatase and Fast Red (goat anti- mouse, Dianova).

RESULTS

Immunohistochemistry

Table 2 shows that cytokeratins are expressed in gland- and in duct- epithelia in a characteristic way:

a) *Normal mammary glands.* The broad-spectrum antibody AE1 (Fig. 1) and the antibodies directed against distinct cytokeratins CAM 5.2 (Fig. 2), and Ks 7.18 or LDS-68 (both CK 7) stain the duct and gland epithelia of all samples evenly. Different results are achieved with AE3 and KL1; KL1 in particular stains the epithelia irregularly. M20 (CK 8) , Ks 18.04 or Cy-90 (both CK 7) and Ks 19.1 (CK 19) appear to be heterogeneous, but Ks 18.04 and Cy-90 recognize all alveolar gland epithelia and most duct epithelia. Ks 19.1 only stains duct and gland epithelia in approximately half of the examined mammary glands, and m20 only stains alveolar epithelia in two cases. Myoepithelium (Fig. 3) is always recognized by CKB1 (CK 14). DE K10 (CK 10) and AE8 (CK 13) also stain duct epithelia irregularly. Ks 17.E3 and E3 (both CK 17), and CK 20 do not react at all.

b) *Neoplasia.* AE1 (Fig. 4) , CAM 5.2 (Fig. 5) and Ks 7.18 recognize all epithelia reliably in each ex-

amined neoplasia. Ks 18.04 or CY-90 and Ks 19.1 stain most of the examined adenocarcinomas. CKB1 (Fig. 6) stains myoepithelium proliferates consistently. The remaining antibodies react very heterogeneously, except for Ks 17.E3 or E3 and CK 20, which are negative in neoplasia.

Biochemistry

SDS-Page

Figure 7 shows the separated protein fractions which is found in the insoluble pellet. More proteins seem to occur in the neoplasia.

Immunoblotting

Western blotting of all samples shows high quality visualization of cytokeratins (Fig. 8). All antibodies react in every sample examined, except for m20, Ks 17.E3, E3 and CK20, which could not be visualized in any of the examined cases. Several bands stain as expected with the broad-spectrum antibodies AE1 and AE3; with KL1 only one smeary band is seen. AE8 reacts with approximately four bands, and Ks 19.1 with two bands. Generally speaking, the neoplastic samples are stained more strongly. With Ks 7.18 and Ks 19.1, additional bands occur in neoplasia, compared to normal mammary tissue. The relative molecular weights that could be determined are shown in Table 3.

DISCUSSION

One of the aims of this study was to characterize neoplasias of canine mammary glands more precisely using the evidence gained from particular cytokeratins. Thus, the subtyping of canine mammary carcinomas was possible. The characterisation of carcinomas using CK patterns has so far only

Table 2. Immunohistochemical and blotting results

Tissue	AE1	AE3	KL1	8/18	7	8	10	13	14	17	18	19	20
Normal mammary gland, n=10													
— Alveolar epithelia	10/0	1/9	3/7	10/0	10/0	2/8	0/10	1/9	0/10	0/10	7/3	5/5	0/10
— Myoepithelia	0/10	0/10	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	8/2	0/10	0/10	0/10	0/10
— Ductus epithelia	10/0	0/10	1/9	10/0	10/0	0/10	5/5	1/9	0/10	0/10	8/2	6/4	0/10
Western Blot	++	+	+	++	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Adenocarcinoma, n=10													
Complex Adenocarcinoma, n=8													
— Epithelial part	8/0	1/7	2/6	8/0	8/0	2/6	2/6	0/8	0/8	0/8	4/4	3/5	0/8
— Myoepithelial part	1/8	0/8	0/8	0/8	1/7	0/8	0/8	0/8	8/0	0/8	0/8	0/8	0/8
Solid carcinoma, n=5	5/0	0/5	2/3	5/0	5/0	0/5	2/3	0/5	0/5	0/5	4/1	3/2	0/5
Western Blot	++	+	+	++	++	-	+	+	+	-	+	++	-

n=number; - no reaction; + clear reaction; ++ very strong reaction.

J.H. Walter, S. Kling

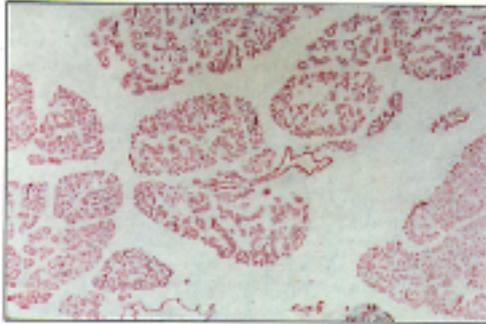


Figure 1: Normal mammary tissue stained with AE1, APAAP, Mayer's hematoxylin counterstain. 4x

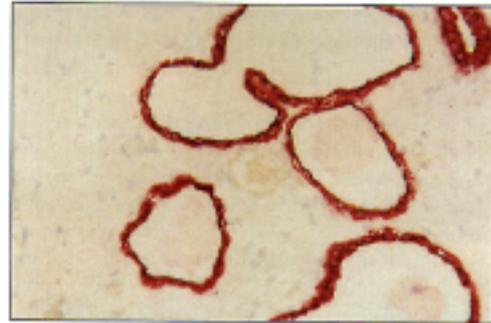


Figure 2: Staining of glandular duct epithelium of normal mammary in formalin fixed and paraffin embedded tissue for CAM 5.2, CK 8/18, APAAP, Mayer's hematoxylin counterstain. 40x



Figure 3: Myoepithelium in normal glands. Stained for CK 14. Frozen section. APAAP, Mayer's hematoxylin counterstain.

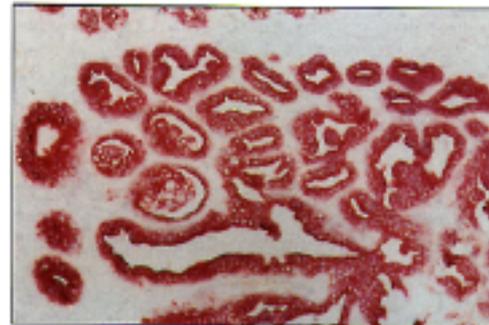


Figure 4: Adenocarcinoma. Stained with AE1. APAAP, Mayer's hematoxylin counterstain. 25x

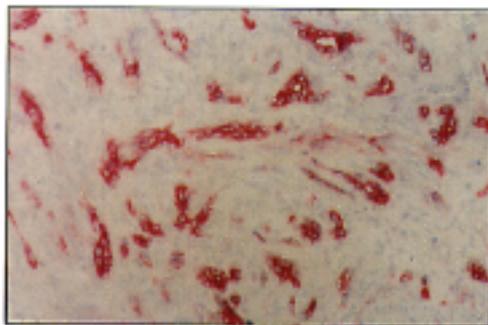


Figure 5: Epithelial part of a complex type adenocarcinoma. Stained for CK 8/18. APAAP, Mayer's hematoxylin counterstain. 25x

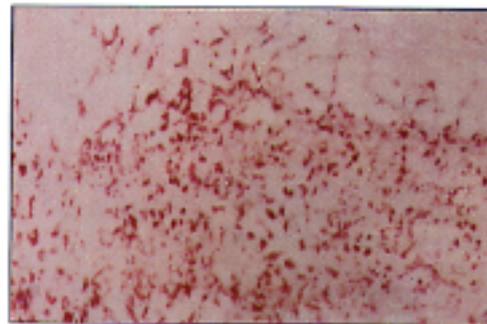


Figure 6: Myoepithelial part of a complex type adenocarcinoma. Stained for CK 14. Frozen section, APAAP, Mayer's hematoxylin counterstain. 10x

Table 3. Relative molecular weights of canine mammary gland cytokeratins on Western Blots (Dalton)

	AE1	AE3	KL1	CK 8/18	CK 7	CK 10	CK 13	CK 14	CK 18	CK 19
Normal mammary glands	49.000	65.000	65.000	46.000	56.000	56.500	53.000	53.000	46.000	49.000
	42.000	60.000					50.000			48.000
	38.000	58.000					45.500			
		50.000					42.000			
Neoplastic mammary glands	49.000	65.000	65.000	46.000	56.000	56.500	53.000	53.000	46.000	49.000
	42.000	60.000			55.000		50.000			48.000
	38.000	58.000			51.000		45.500			47.500
		50.000			49.000		42.000			46.000
					47.000					44.000
					44.000					42.000
					41.000					
					39.500					

been carried out in a few cases in human pathology¹⁷. The immunoblotting results prove that the antisera AE1, AE3, CK8/18, CK7, CK10, CK13, CK14, CK18 and CK19 react specifically, and that the cytokeratins of canine mammary glands are expressed similarly to those in human mammary glands^{17,18}. The immunohistochemical results with the antibody CK8 must be seen as non-specific as they did not react on Western blots. The canine cytokeratins 8, 17 and 20 could therefore not be shown with the antibodies as used in our experiments. The reacting antibodies produce bands on Western blots which have similar molecular weights to those of human samples¹⁸. However, CK13 detects extra bands in normal tissue, and CK7 and CK19 detect extra bands in neoplastic tissue. One reason for this is that, during the preparation of cytoskeletal fractions, degradation products occur which have epitopes that are recognized by the antibodies.

The results of this study differ slightly from those of Vos et al. (1993a, b, c). These authors see an expression pattern that is often heterogeneous. Our results show that CK7, 18 and 19, which are typical for simple epithelium, can always be detected, and that CK14, which is typical for stratified epithelium, is found consistently and homogeneously in myoepithelia of normal and neoplastic canine mammary glands. Thus, normal and neoplastic mammary tissue can be adequately characterized. Griffey et al. (1993) obtained similar results in canine mammary tissue with immunohistochemistry, using AE1/AE3, CK18 and 14, whereas Destexhe et al. (1993) could also stain myoepithelial cells with CK19. Equivalent results were described by Arai et al. (1994) who used specific MABs against canine 57 kDa cytokeratine.

With these results a direct comparison can be drawn between the expression of cytokeratins in canine mammary tissues and the reactivity of human

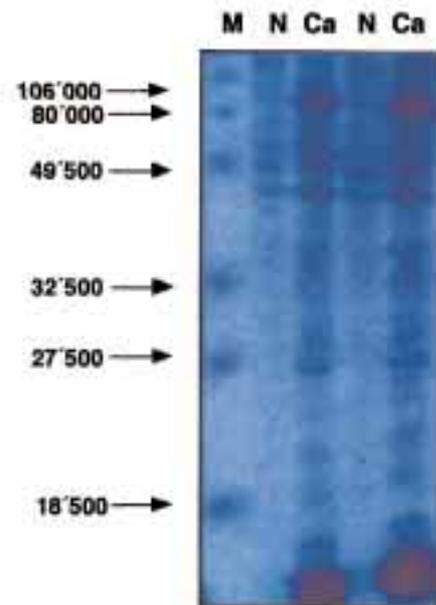


Figure 7: SDS-Page of Adenocarcinoma and normal mammary gland. Coomassie Blue stained. Lane 1=Markerproteins (M); lane 2, 4 = normal mammary gland (N); lane 3, 5=adenocarcinoma (Ca); molecular weights in Dalton.

mammary tissue, where CK5, 13, 14, 15 and 16, which are typical for squamous epithelium, and CK7, 18 and 19, which are typical for simple epithelium, can be found¹⁷.

The Western blot results confirm that detecting cytokeratins with the antibody AE1 is an important tool for diagnosing undifferentiated blastomas as carcinomas. AE1 should be suitable for detecting carcinoma cells of mammary tissue with fine-needle biopsy, or micrometastases of mammary carcinomas

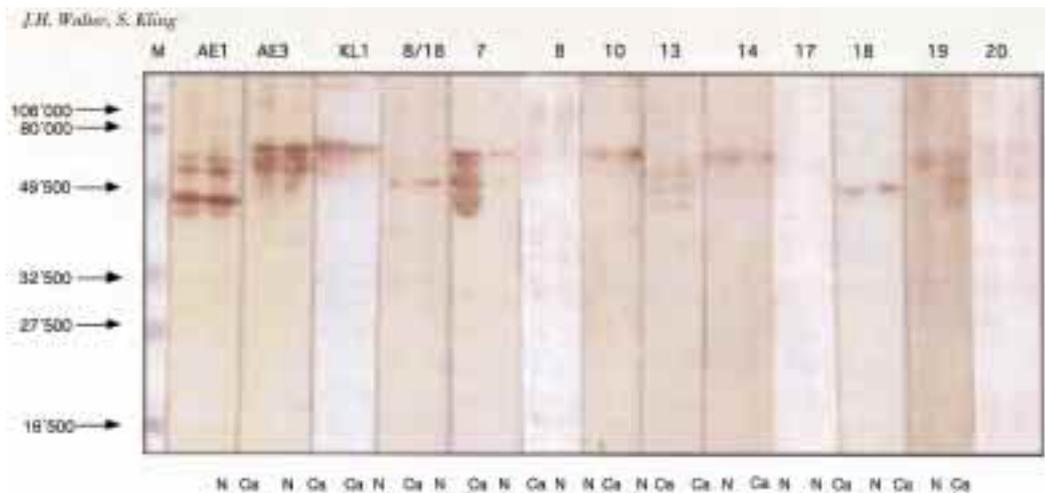


Figure 8: Western Blot of normal and neoplastic mammary tissues, Stained with different antibodies. M=Markerproteins; lanes: Antibodies against CK; molecular weights in Dalton; N=normal mammary gland; Ca=adenocarcinoma.

in lymph nodes. Moreover, we could show that carcinoma cells have originated from mammary tissue by using MAbs against cytokeratins 7, 14, 18 and 19.

As the characterisation and diagnosis of the myoepithelial component of canine mammary tumors is still unclear^{9,15,16,20} besides α -smooth muscle actin²⁷⁻²⁹ an CK14 assay is of great importance. CK14 is another important criterion in morphologically unclear cases, (unlike S-100 protein¹⁹), but it can only be demonstrated using frozen sections.

Further research is therefore necessary to produce a catalogue of canine cytokeratins, comparable to that of human cytokeratins¹⁹. From such a catalogue, further subcharacterisations of mammary, and of other tumors, could be established.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by the Kommission für Forschung und Wissenschaftlichen Nachwuchs, Freie Universität Berlin. We thank Mrs S. Hahn for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. ACHTSTÄTTER T, HATZFELD M, QUINLAN RA, PARMELEE DC, FRANKE WW, 1986: Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoresis and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods Enzymol*, 134, 355-371.
2. ALTMANNBERGER M, OSBORN M, SCHAUER A, WEBER K, 1981: Antibodies to different intermediate filament proteins are cell type specific markers on fixed and paraffin embedded human tissues. *Lab Invest*, 45, 427-434.
3. ARAI K, KANEKO S, NAOI M, SUZUKI K, MARUO K, UEHARA K, 1994: Expression of stratified squamous epithelia-type cytokeratin by canine mammary epithelial cells during tumorigenesis: Type I (acidic) 57 kilodalton cytokeratin could be a molecular marker for malignant transformation of mammary epithelial cells. *J Vet Med Sci*, 56, 51-58.
4. CORDELL JL, FALINI B, ERBER WN, GHOSH AK, ABDULAZIZ Z, MACDONALD S, PULFORD KAF, STEIN H, MASON DY, 1984: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP) complexes. *J Histochem Cytochem*, 32, 219-229.
5. DESTEXHE E, LESPAGNARD L, DEGEYTER M, HEYMANN B, COGNOUL F, 1993: Immunohistochemical identification of myoepithelial and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 30, 146-154.
6. FERGUSON HL, 1983: Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am*, 15, 501-511.
7. GILLET CE, BOBROW LG, MILLIS BR, 1990: S 100 protein in human mammary tissue immunoreactivity in breast carcinoma, including Paget's disease of the nipple, and value as a marker of myoepithelial cells. *J Pathol*, 160, 19-24.
8. GOWN AM, VOGEL AM, 1985: Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. III. Analysis of tumors. *Am J Clin Pathol*, 84, 413-424.
9. GRIFFEY SM, MADEWELL BR, DAIRKEE SH, HUNT JE, NAYDAN DK, HIGGINS BJ, 1990: Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Vet Pathol*, 30, 155-161.

10. HAMPE JF, MISDORP W, 1974:
Tumors and dysplasias of the mammary gland.
Bull WHO, 50, 111-133.
11. HYNES R, DESTREE A, 1978:
10 nm filaments in normal and transformed cells.
Cell, 13, 151-163.
12. LAEMMLI UK, 1970:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T.
Nature, 227, 680-685.
13. MCVEAN DW, MONLUX AW ANDERSON jr PS, SILBERG SL, ROSZEL JF, 1978:
Frequency of canine and feline tumors in a defined population.
Vet Pathol, 15, 700-715.
14. MIALOT M, LAGADIC M, 1990:
Epidémiologie descriptive des tumeurs du chien et du chat.
Revue Méd Vét, Spéc Cancérol, 937-947.
15. MISDORP W, COTCHIN E, HAMPE JF, JABARA AG, SANDERSLEBEN J von, 1972:
Canine malignant mammary tumours. II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas.
Vet Pathol, 9, 447-470.
16. MISDORP W, COTCHIN E, HAMPE JF, JABARA AG, SANDERSLEBEN J von, 1973:
Canine malignant mammary tumours. III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours.
Vet Pathol, 10, 241-256.
17. MOLL R, 1993:
Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren=Cytokeratins as markers of differentiation: expression profiles in epithelia and epithelial tumors. Veröffentlichungen aus der Pathologie/Progress in Pathology, 142, 1-191.
18. MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL, 1982:
The catalogue of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.
Cell, 31, 11-24.
19. MOLLER AC, HELLMEN E, 1994:
S100 protein is not specific for myoepithelial cells in the canine mammary gland.
J Comp Pathol, 110, 49-55.
20. NERURKAR VR, CHITALE AR, JAINAPURKAR BV, NAIK SN, LALITHA VS, 1989:
Comparative pathology of canine tumours.
J Comp Pathol, 101, 389-397.
21. OSBORN M, WEBER K, 1983:
Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology.
Lab Invest, 48, 372-394.
22. QUINLAN RA, SCHILLER DL, HATZFELD M, ACHSTÄTTER T, MOLL R, JORGANO JL, MAGIN TM, FRANKE WW, 1985:
Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments.
Ann NY Acad Sci, 455, 282-306.
23. RABANAL RM, RW ELSE, 1994:
Immunohistochemical localisation of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in canine mammary tumours.
Res Vet Sci, 56, 225-233.
24. SCHNEIDER R, 1970:
Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer.
Cancer, 26, 419-426.
25. STRANDBERG JD, GOODMAN DG, 1974:
Animal model of human disease.
Am J Pathol, 75, 225-233.
26. TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J, 1979:
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications.
Proc Natl Acad Sci USA, 76, 4350-4354.
27. VOS JH, VAN DEN INGH TSCAM, MISDORP W, MOLENBEEK RF, VAN MIL FN, RUTTEMAN GR, IVANYI D, RAMAEKERS FCS, 1993a:
Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and α -smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: benign mammary tumours and duct ectasias.
Vet Quart, 14, 89-95.
28. VOS JH, VAN DEN INGH TSCAM, MISDORP W, MOLENBEEK RF, VAN MIL FN, RUTTEMAN GR, IVANYI D, RAMAEKERS FCS, 1993b:
Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and α -smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: malignant mammary tumours.
Vet Quart, 14, 96-102.
29. VOS JH, VAN DEN INGH TSCAM, MISDORP W, MOLENBEEK RF, VAN MIL FN, RUTTEMAN GR, IVANYI D, RAMAEKERS FCS, 1993c:
Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and α -smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: normal mammary tissue.
Vet Quart, 14, 102-107.
30. WALTER JH, SCHWEGLER K, 1992:
Untersuchungen zur Häufigkeit von Neoplasien bei sexierten Hunden in Berlin (West).
J Vet Med A, 39, 328-341.
31. WOLFE LC, SMITH BR, TOIVIO-KINNUCAN MA, SARTIN EA, KWAPIEN RP, HENDERSON RA, BARNES S, 1986:
Biologic properties of cell lines derived from canine mammary carcinomas.
J Natl Canc Inst, 77, 783-792.
32. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981:
Histological typing of breast tumours, 2nd ed.
Geneva: WHO.

4.4.2 Detektion okkultter Metastasen von Karzinomen der Mamma in Lymphknoten¹

Einleitung

Mammatumoren gehören zu den häufigsten Neoplasien der alternden Hündin (Ferguson 1985; MacVean et al. 1978) mit einer Prävalenz von bis zu 50% (Bastianello 1983; Fidler, Abt, and Brodey 1967; Mialot and Lagadic 1990; Simon et al. 1996; von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973), wobei in definierten Hunde-Populationen die geschätzte jährliche Erkrankungsrate für maligne Mammatumoren zwischen 198,8 und 278,2 Fälle pro 100.000 Individuen beträgt (zum Vergleich: Katze: 25,4, Mensch: 81,1 Fälle/ 100000) (Dorn and Schneider 1976; Dorn et al. 1968a; Dorn et al. 1968b; MacVean et al. 1978; Schneider 1970). Nicht nur für die Humanmedizin gilt, daß die weitaus meisten Tumorpatienten nicht an der Primärgeschwulst selbst, sondern an den Metastasen sterben (Fidler and Hart 1982; Liotta 1986; Liotta 1992; Liotta, Steeg, and Stetler-Stevenson 1991; Weiss et al. 1981), wobei es einen signifikanten Nachteil hinsichtlich der Überlebensrate bei Frauen mit (Mikro-)Metastasen gibt ((Ludwig) Breast Cancer Study Group 1990; Clayton and Hopkins 1993). Nach 4-5 Jahren leben von „metastasenpositiven“ Frauen nur noch knapp 50 %. Um okkulte Metastasen sicher ansprechen zu können, wurde in einem Konsensus-Workshop auf der internationalen Konferenz des National Institute of Health (Bethesda, U.S.A.) im Juni 1992 die Färbung von Lymphknotenexzidaten mit monoklonalen Antikörpern gegen Zytokeratine empfohlen (Pantel, Koproński, and Riethmüller 1993).

Beim Hund ist dies nicht immer so klar einschätz- und nachweisbar. Zwar

¹ In Zusammenhang mit dieser Untersuchung entstand die Dissertation: Ulrich Busch. *Immun - histochemischer Nachweis okkultter Tumorzellemboli und Mikrometastasen in regionären Lymphknoten von Hündinnen mit Mammakarzinomen*, Berlin 1993.

metastasieren bei der Hündin invasive wachsende Karzinome auch häufig (Allen and Mahaffey 1989; Bostock 1986; Yamagami et al. 1996), und folgedessen müßte eine Metastasierung lebensverkürzend sein, doch gehen die Meinungen über die Bedeutung von Metastasen für die Prognose auseinander: Während einerseits Metastasen in den regionären Lymphknoten der Mamma ebensowenig Einfluß auf die Überlebensrate wie eine Lymphangiosis carcinomatosa haben sollen (Misdorp and Hart 1976; Misdorp and Hart 1979a; Misdorp and Hart 1979b; Owen 1979) konstatieren andere Untersucher eine schlechte Prognose für Tiere mit Metastasen (Allen and Mahaffey 1989; Gilbertson et al. 1983; Hellmén et al. 1993; Yamagami et al. 1996).

Das Vorliegen von Mikrometastasen, die mit konventioneller bildgebender Diagnostik und Tumormarkern nicht erkannt werden können, bezeichnet man als minimale residuale Krebserkrankung (MRK). Probleme stellen Differenzierung und Definition von Mikro- und Makrometastasen sowie Tumorzellemboli dar (Galea et al. 1991). Dies wurde beispielhaft anlässlich eines Rundtischgespräches auf der 68. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Berlin (1984) klar: Während verschiedene Pathologen wie Bässler, Doerr, Hübner, Lennert oder Ronay (Georgii 1984) schon einzelne Tumorzellen als Mikrometastase bezeichneten – eine Ansicht die beispielsweise auch Stosiek et al. (1991) teilen – verneinten andere dies [z.B. Schauer (Georgii 1984)]. Die Gründe für die Befürwortung liegen in der prognostischen Bedeutung (Georgii 1984), da eine Tumorzelle im Sinusraum des Lymphknotens einem Einbruch gleichkomme und daher als Metastase angesehen werden muß. Um für die Veterinärmedizin Basisdaten zu erhalten, sollen in dieser Untersuchung einerseits die Häufigkeit okkulter Metastasen festgestellt werden und andererseits ein Methodenvergleich zwischen H.E.-Schnitten und immunhistochemischen Konsekutivschnitten von Lymphknoten durchgeführt werden, wobei der monoklonale Antikörper AE1, der gegen die Zytokeratine 14, 15, 16 und 19 gerichtet ist (siehe dazu auch Kapitel 4.3), zum Einsatz gelangen soll.

Material und Methoden

Für die Untersuchung wurden 77 canine Mammagewebe mit je einem regionären Lymphknoten aus dem Biopat-Archiv des Institutes für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin verwendet. Die Gewebe gelangten zwischen September 1988 und Januar 1992 zur routinemäßigen Untersuchung, waren in der Regel in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Rasse, Alter und Geschlecht dieser Tiere wurden erfaßt. In 77 der inguinalen Lymphknoten, die von 76 Tieren stammten (ein Tier wurde zweimal operiert), waren bei der Erstbefundung routinehistologisch keine Metastasen entdeckt worden. Von den Lymphknoten wurden 3 Ebenen im Abstand von jeweils etwa 300 µm geschnitten. Von jeder dieser Ebenen wurden 4 Serienschritte mit einer Dicke von ca. 2 µm auf silanbeschichtete Objektträger aufgezogen, wobei ein Schnitt für die Negativkontrolle eingesetzt wurde und einer als Reserve diente. Aus jeder Ebene wurden ein Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie ein immunhistochemischer gefärbter Schnitt hergestellt. Für

die immunhistochemischen Untersuchungen wurde der monoklonale Antikörper AE1 (siehe Kapitel 4.4.1) in einer Verdünnung von 1:600 nach Vorbehandlung der Schnitte mit 0,1% Pronase eingesetzt. AE1 ist gegen die sauren Zytokeratine 14, 15, 16 und 19 des Menschen gerichtet (Kainz et al. 1993) und zeigt beim Hund eine weitgehende Kreuzreaktion (siehe Kapitel 4.4.1). Der Nachweis einer Reaktion erfolgte mit einer leicht modifizierten APAAP-Technik (Cordell et al. 1984). Von den 77 entsprechenden Mammatumoren wurden ebenso, sofern sie nicht im gleichen Paraffinblock mit dem Lymphknoten eingebettet waren (in 19 Fällen), jeweils ein HE- und ein AE1-gefärbter Schnitt angefertigt.

Auswertungskriterien

Eine Zelle wurde als AE1-positiv befundet, wenn das immunreaktive Zytoplasma direkten Kontakt mit einem Zellkern aufwies und mit anderen Zellen in einer Schnittebene lag.

Ein Tumorzellverband lag vor, wenn alle involvierten Zellen untereinander in unmittelbarem Kontakt standen und in einer Schnittebene lagen.

Semiquantitativ wurde die Größe der Metastasen in den Lymphknoten folgendermaßen unterteilt:

- Eine Tumorzelle oder ein Zellverband von zwei Tumorzellen wurde als I+,
- ein Zellverband von 3 – 50 Tumorzellen wurde als II+,
- ein Zellverband von 51 – 250 Tumorzellen wurde als III+ und
- ein Zellverband von mehr als 251 Tumorzellen wurde als IV+.
- Zytokeratinpositive Makrophagen wurden als M angesprochen.

I+ sind Tumorzellemboli, II+, III+ und IV+ Mikrometastasen.

Die Lokalisationen der Tumorzellemboli und Mikrometastasen in den Lymphknoten wurden in ihren anatomisch-histologischen Funktionseinheiten quantitativ erfaßt:

Der „Sinusraum“ mit seinem Rand-, Intermediär- und Marksinus, das „Parenchym“ mit Kortex, Parakortex und Mark. Weiterhin wurden Tumorzellemboli in Gefäßen außerhalb des Lymphknotens vermerkt. Tumorzellen, die sich keinem dieser oben genannten Bereiche zuordnen ließen, entweder aufgrund fortgeschrittener Veränderung des Lymphknotengewebes, oder da nur ein Teil eines Lymphknotens eingesandt wurde, wurden als „NZ“ (nicht zuordenbar) aufgeführt.

Ein Lymphknoten wurde dann als mikrometastasenpositiv befundet, wenn er mindestens in einer seiner drei Schnittebenen Metastasen der Größe II+ aufwies. Ausgenommen waren positive Reaktionen in Gefäßen und zytokeratinpositive Makrophagen (M).

Ein Lymphknoten wurde als metastasenfrees angesehen, wenn er keine markierten Zellen außer zytokeratinpositiven Makrophagen, nur in den Blutgefäßen positiv markierte Tumorzellen, egal welcher Größe, nur Tumorzellemboli der Größe I+, unabhängig von ihrer Anzahl, enthielt.

Die 77 HE-gefärbten Lymphknotenschnitte wurden in drei Ebenen ohne Angabe ihrer Eingangsnummer neu befundet. Diese Befunde wurden mit dem immunhistochemischen Ergebnis nach folgenden Kriterien verglichen:

Als übereinstimmend wurde der Vergleich gewertet, wenn histologische und immunhistochemische Befunde positiv bzw. negativ in identischen Lymphknotenbereichen waren.

Als nicht übereinstimmend galt der Vergleich, wenn histologischer und immunhistochemischer Befund zwar positiv waren, jedoch unterschiedliche Lymphknotenbereiche erkannt wurden,

sowie wenn histologische oder immunhistochemische Befunde nicht korrespondierten.

Ergebnisse

Rassenverteilung

Die Rassenverteilung und das Durchschnittsalter der untersuchten Tiere gibt Tabelle 4.4.2-1 wieder. Von 4 Tieren, zwei Teckel und je ein Terrier und Cocker-Spaniel lagen keine Altersangaben vor.

Von den 76 Patienten waren sechs (7,9 %) Hündinnen kastriert, weitere fünf wurden zum Zeitpunkt der Mammaoperation ovariohysterektomiert.

Mammatumore

Die untersuchten Mammatumore bestanden aus 59 Adenokarzinomen, 36 Karzinomen, zwei Plattenepithelkarzinomen und einem Fibrosarkom, wobei in 19 Fällen ein Adenokarzinom mit einem Karzinom, in zwei Fällen ein Adenokarzinom mit einem Plattenepithelkarzinom und in einem Fall ein Karzinosarkom (Adenokarzinom und Fibrosarkom) zusammen vorlagen. Eine myoepitheliale Beteiligung war bei insgesamt 33 Tumoren zu beobachten.

Die 59 Adenokarzinome gliederten sich in 43 einfache und in 16 komplexe Tumoren auf. 13 der 43 einfachen und drei der 16 komplexen Karzinomen zeigten zystisches Wachstum.

Die 36 soliden Karzinome teilten sich gleichermaßen in 18 einfache und 18 komplexe Karzinome auf. Die Epithelien aller 77 untersuchten Mammakarzinomen, die als immunhistochemische Positivkontrolle mitgefärbt wurden, reagierten einheitlich positiv; die Negativkontrollen reagierten nicht.

Lymphknoten

In 66 der 77 untersuchten Lymphknoten konnten immunhistochemisch zytokeratinpositive Reaktionen nachgewiesen werden: 53 (68,8 %) Lymphknoten enthielten Tumorzellemboli und Mikrometastasen (I+, II+, III+, IV+), 12 (15,6 %) nur Tumorzellemboli (I+), 11 (14,3 %) keine Tumorzellen und einer (1,3 %) ausschließlich immunreaktive Makrophagen.

Von den jeweiligen drei Ebenen der 77 Lymphknoten reagierten insgesamt 151 (65,4 %) zytokeratinpositiv, d.h. in ihnen war mindestens eine Tumorzelle ent-

Tabelle 4.4.2-1
Rassenverteilung und Alter

<i>Rang</i>	<i>Rasse</i>	<i>Anzahl (n)</i> <i>[Alter unbekannt]</i>	<i>Mittelwert Alter</i> <i>(Jahre)</i>
1	Mix,	18	10,2
	–Dt. Schäferhund-Mix	4	10,3
	–Pudel-Mix	1	13,5
	–Collie-Mix	1	10,0
	–o. A.	12	—
2	Terrier:	13	9,0
	–Yorkshire–T.	5	9,4
	–Foxterrier	3	11,9
	–Bedlington–T.	1	11,0
	–West–Highland–T.	1	10,0
	–Tibet–T.	1	5,0
	–Stafford–T.	1	5,0
	–Scotchterrier	[1]	—
3	Teckel	11 [2]	8,5
4	Cocker–Spaniel	7 [1]	9,0
5	Dt. Schäferhund	5	9,0
6	Pudel	4	9,8
6	Boxer	4	5,5
8	Windspiel	2	10,3
8	Dt.Langhaar	2	11,5
8	Beagle	2	8,8
8	Pinscher:	2	10,5
	–Pinscher	1	15,0
	–Dobermann	1	6,0
12	Zwergschnauzer	1	13,5
12	Shi–Tsu	1	11,5
12	Briard	1	9,0
12	Hovawart	1	8,0
12	Husky	1	5,0
12	Chihuahua	1	5,0
	<i>Summe</i>	<i>76</i>	<i>9,2</i>

halten. Von den 151 Schnitten waren in 55 (36,4 % der zytokeratinpositiven, 23,8 % aller angefertigten Schnitte) nur Tumorzellemboli (I+), in 93 (61,6 % der zytokeratinpositiven, 40,3 % aller angefertigten Schnitte) Mikrometastasen (II+, III+, IV+) und in drei (1,3 % aller zytokeratinpositiven) positiv reagierende Makrophagen zu beobachten.

In den 65 positiven Lymphknoten befanden sich insgesamt 530 Mikrometastasen, an denen II+ mit 480 (90,6 %) den größten Anteil aufwies, gefolgt von III+ mit 44 (8,3 %) und IV+ mit 6 (1,1 %). Zwei Lymphknoten fielen durch

ihre hohe Anzahl an positiven Markierungen auf. Sie stellten allein 56,5 % aller positiven Markierungen bzw. 51,9 % aller Metastasen. Ohne diese beiden Ausreißer hätten sich in den übrigen 63 Lymphknoten die jeweiligen Anteile von II+, III+ und IV+ an allen Metastasen nur geringfügig (II+: von 90,6 % auf 87,6 %; III+: von 8,3 % auf 10,5 %; IV+: von 1,1 % auf 1,9 %) verschoben.

Die zytokeratinpositiven Reaktionen verteilten sich wie folgt: Der Kortex war bei 51, der Randsinus bei 35, das Mark bei 24, der Intermediärsinus bei 23, der Parakortex bei 20 und der Marksinus nur bei 12 Lymphknoten betroffen. Die Auswertung aller positiven Reaktionen ergab, daß der Kortex mit 486 (35,8 %) die meisten Markierungen aufwies, gefolgt vom Randsinus mit 296 (21,8 %), Intermediärsinus mit 263 (19,4 %), Parakortex mit 148 (10,8 %), Mark mit 117 (8,6 %) und die Marksinus mit 49 (3,6 %) Markierungen. Der Sinusbereich (44,8 %) und das Parenchym (55,2 %) waren beinahe gleichmäßig von allen positiven Markierungen betroffen. Die Tumorzellemboli der Größe I+ wurden im Kortex mit 285 (21 %) Markierungen am häufigsten angetroffen, gefolgt von I+ im Randsinus mit 196 (14,4 %) und II+ im Kortex mit 170 (12,5 %) Reaktionen. Aufgeteilt nach dem Umfang der Markierungen ergab sich folgendes (siehe Tabelle 4.4.2-2):

Tumorzellemboli der Größe I+ wurden am häufigsten im Intermediärsinus mit durchschnittlich 6,6, gefolgt vom Kortex und Randsinus mit je 5,7 Reaktionen pro Lymphknoten, festgestellt. Der Sinusraum war stärker betroffen als das Parenchym (5,1 zu 4,4 Reaktionen).

Die meisten Mikrometastasen der Größe II+ wurden im Intermediärsinus und Kortex festgestellt (Abb. 4.4.2-3) mit 4,7 bzw. 3,4 Markierungen pro Lymphknoten. Der Randsinus beinhaltete im Verhältnis weniger Reaktionen als bei I und wies, wie auch der Parakortex, 2,7 Reaktionen pro Lymphknoten auf. Der Sinusraum war somit am stärksten vertreten, doch war der Abstand zum Parenchym gering (2,8 zu 2,6).

Mikrometastasen der Größe III+ konnten am häufigsten im Kortex (0,5 pro Lymphknoten) nachgewiesen werden (Abb. 4.4.2-1 und -2). Der Marksinus, der bei I und II am wenigsten betroffen war, folgte an zweiter Stelle mit 0,3 Reaktionen. Das Parenchym war stärker in das Metastasengeschehen involviert als der Sinusraum (0,3 zu 0,2 Reaktionen pro Lymphknoten).

Bei Mikrometastasen der Größe IV+ gewann das Parenchym weiter an Bedeutung: Es wies 0,2 gegenüber dem Sinusraum mit 0,07 Reaktionen pro Lymphknoten auf. Der Parakortex war am stärksten betroffen mit durchschnittlich 0,3 Markierungen.

Beim Vergleich der Zahlenwerte mit und ohne Ausreißer fiel auf, daß der Inter-

mediärsinus (bei I+ und II+) ohne die Ausreißer an Bedeutung verliert. Dadurch verteilen sich schon kleine, bis zu 50 Tumorzellen umfassende Mikrometastasen (II+), gleichmäßiger über den ganzen Lymphknoten. Das jeweilige Verhältnis von Sinusraum und Parenchym blieb davon jedoch unberührt.

47 positive Markierungen in den Lymphknoten konnten keiner Funktionseinheit zugeordnet werden, da entweder der Lymphknoten stark verändert oder nur ein Teil eines Lymphknotens zur Befundung vorlag. 37 Reaktionen waren Tumorzellemboli (I+), 10 Mikrometastasen (8 II+; 2 III+).

In Gefäßen der unmittelbaren Lymphknotenperipherie (Abb. 4.4.2-4) wurden 137 Tumorzellemboli gefunden, die bei der Befundung der Lymphknoten unberücksichtigt blieben. Von den Größen I+ und II+ lagen fast gleich viele (69 bzw. 64), von III+ nur vier Reaktionen vor.

Diese geschilderten Verteilungsmuster lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

a) Je größer die Tumorzellansammlungen, desto

Tabelle 4.4.2-2

Durchschnittliche Anzahl von positiven Reaktionen in den verschiedenen Bereichen eines Lymphknotens [LK]

<i>Bereich</i>	<i>Anzahl der I+ Reaktionen/ LK</i>	<i>Anzahl der II+ Reaktionen/ LK</i>	<i>Anzahl der betroffenen LK (n)</i>
Randsinus	5,7 (3,1)*	2,7 (2,3)*	34 (32)
Intermediärsinus	6,6 (1,5)	4,7 (1,2)	23 (21)
Marksinus	3,1 (0,2)	1,1 (1,0)	11 (9)
Kortex	5,7 (2,9)	3,4 (1,4)	50 (48)
Parakortex	4,6 (2,4)	2,7 (0,8)	19 (17)
Mark	3,0 (1,4)	1,7 (1,0)	23 (21)
Sinusraum	5,1 (1,6)	2,8 (1,5)	
Parenchym	4,4 (2,2)	2,6 (1,1)	
<i>Bereich</i>	<i>Anzahl der III+ Reaktionen/LK</i>	<i>Anzahl der IV+ Reaktionen/ LK</i>	<i>Anzahl der betroffenen LK (n)</i>
Randsinus	0,2 (0,2)*	0,03 (–)*	34 (32)
Intermediärsinus	0,1 (0,0)	0,1 (–)	23 (21)
Marksinus	0,3 (0,3)	—	11 (9)
Kortex	0,5 (0,4)	0,1 (–)	50 (48)
Parakortex	0,2 (0,2)	0,3 (–)	19 (17)
Mark	0,2 (0,2)	0,2 (–)	23 (21)
Sinusraum	0,2 (0,2)	0,07 (–)	
Parenchym	0,3 (0,3)	0,2 (–)	

I+: 1 Tumorzelle oder ein Zellverband von 2 Tumorzellen; **II+:** Zellverband von 3 – 50 Tumorzellen; **III+:** Zellverband von 51 – 250 Tumorzellen; **IV+:** Zellverband von mehr als 251 Tumorzellen; **()***: In Klammern die Werte ohne die beiden Ausreißer; **n:** Gesamtzahl

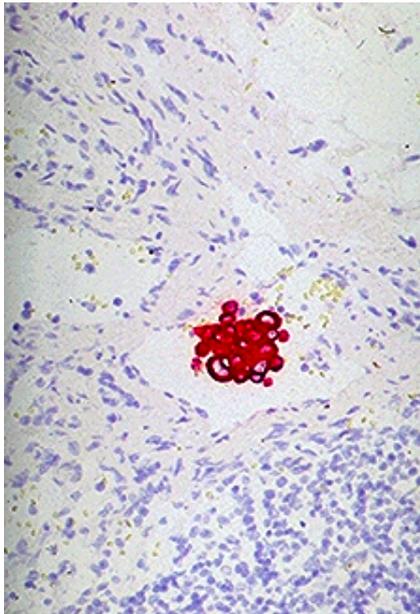


Abbildung 4.4.2-1

Mikrometastase der Größe III+ am Übergang Intermediärsinus Cortex; AE1, APAAP

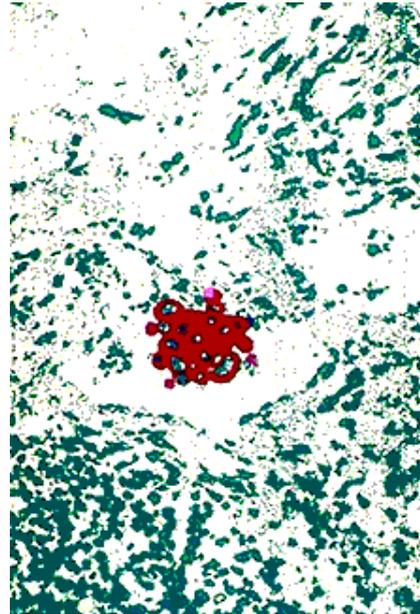


Abbildung 4.4.2-2

Wie Abb. 4.4.2-1: Pseudocolor-Darstellung

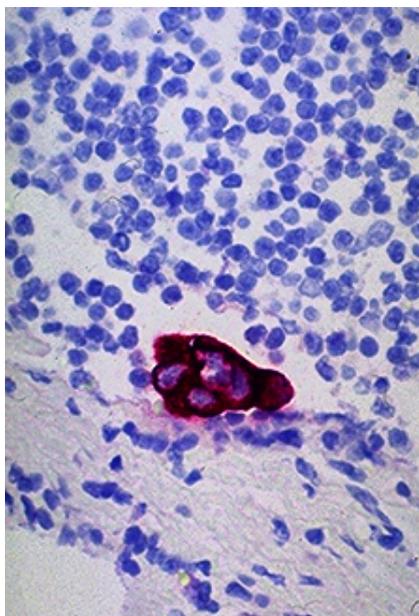


Abbildung 4.4.2-3

Mikrometastase der Größe II im Randsinus; AE1, APAAP

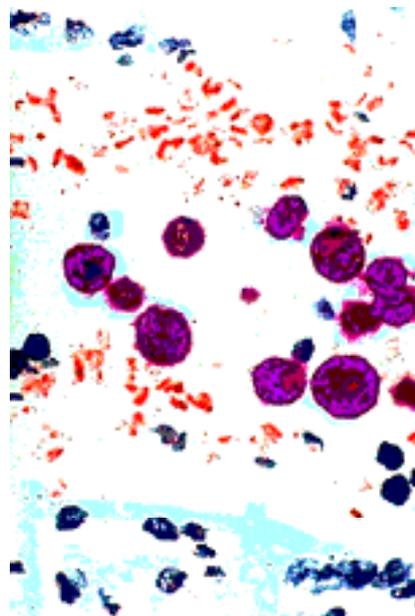


Abbildung 4.4.2-4

Tumorzellemboli in einem Gefäß in der Lymphknoten Umgebung (Angiosis carcinomatosa); AE1, APAAP. Pseudocolor-Darstellung

gleichmäßiger sind Mikrometastasen auf die einzelnen Funktionsbereiche verteilt,

stärker ist der Marksinus betroffen,

stärker ist das Parenchym in das Geschehen involviert, besonders bei III+ und IV+, bei denen es durchschnittlich mehr Markierungen pro Lymphknoten als der Sinusraum aufwies.

- b) Tumorzellen gelangen nach Ankunft im Lymphknoten zunächst vermehrt in den Sinusraum. Nachdem sie an Umfang zugenommen bzw. sich zu Mikrometastasen entwickelten, lassen sich diese vermehrt im Parenchym finden.

Metastasierungsmuster

Insgesamt metastasierten in die Lymphknoten:

Invasive Karzinome:

- 66,6 % der einfachen soliden Karzinomen
- 81,5 % der einfachen Adenokarzinomen
- 57,2 % der Karzinomen, die sowohl einem einfachen soliden Anteil als auch einem einfachen adenokarzinomatösen Anteil aufwiesen.

Expansive Karzinome:

- 45,5 % aller komplexen Adenokarzinomen
- 70 % der komplexen soliden Karzinomen
- 1/1 Karzinom mit sowohl einem komplexen soliden als auch einem komplexen adenokarzinomatösen Anteil.

Karzinome mit invasiven und expansiven Anteilen:

- 50 % der Karzinome mit einem einfachen soliden und einem komplexen adenokarzinomatösen Anteil.
- 71,4 % der Karzinomen mit einem soliden komplexen und einem einfachen adenokarzinomatösen Anteil.
- 50 % Karzinomen mit einem einfachen adenokarzinomatösen Anteil und einem Plattenepithelkarzinom.

Karzinosarkom

- Ein Tumor mit fibrosarkomatösen und adenokarzinomatösen Anteilen, metastasierte nicht.

Insgesamt metastasierten somit 59,1 % aller expansiven (komplexe Karzinome und Adenokarzinome) und 72,1 % aller invasiven Karzinome (einfache Karzinome, Adenokarzinome).

Es ist nicht festzustellen, sofern der Mammatumor zwei verschiedene Karzi-

Tabelle 4.4.2-3
Metastasierungsverhalten der Karzinomtypen

<i>Karzinomtyp</i>	<i>Anzahl</i>	<i>LK-MIME +</i>	<i>LK-MIME -</i>
Adenokarzinome			
einfach	22	15	6
komplex	10	7	3
tubulär	3	2	1
tubulär-komplex	3	–	3
papillär	2	2	–
papillär-zystisch	3	3	–
papillär-zystisch-komplex	1	–	1
tubulär-papillär	2	2	–
tubulär-papillär-zystisch	3	2	1
zystisch	7	6	1
zystisch-komplex	2	1	1
Karzinome			
solide-einfach	18	11	7
solide-komplex	18	13	5
Plattenepithelkarzinom	2	1	1
Karzinom Sarkom	1	–	1

LK-MIME: Lymphknotenmikrometastase; +: positiv; -: negativ

nomqualitäten aufwies, von welchem der beiden Karzinome die Geschwulstzellabsiedelung im Lymphknoten ausgeht. In Tabelle 4.4.2-3 wurde von der Möglichkeit ausgegangen, daß beide Karzinomanteile zu gleichen Teilen metastasiert hatten. In diesem Fall erhöhte sich die Zahl der metastasierenden Karzinome bei den expansiven von 59,1 % auf 60 % und verringerte sich bei den invasiven von 72,1 % auf 67,3 %.

Vergleich zwischen H.E.– und immunhistochemischer Färbung

Bei der H.E.-Nachuntersuchung der 77 Lymphknoten in drei Schnittebenen wurden 49 Mikrometastasen entdeckt; davon wurden 17 als sicher und 32 als verdächtig angesprochen. 28 Lymphknoten wurden als metastasenfrei angesehen. Verglichen mit dem Ergebnis der immunhistochemischen Befunde, 53 metastasenpositive und 24 metastasenneegative Lymphknoten, scheinen die Ergebnisse sehr ähnlich. Doch bei der Verifizierung der H.E.– mit den jeweils entsprechenden immunhistochemischen Schnitten ergibt sich ein differenzierendes Bild (Tabelle 4.4.2-4):

Von den 53 immunhistochemisch positiv verifizierten Lymphknoten waren 37

Tabelle 4.4.2-4

Vergleich der immunhistochemischen Befunde mit den HE-Befunden

HE	n	IHC	n	Lokalisation	
				Unter- schiedl.	Gleich
MIME	17	IHC+	16	5	11
		IHC—	1		
Verdacht	32	IHC+	21	10	11
		IHC— (Emboli)	5	4	1
		IHC—	6		
Negativ	28	IHC+	16		
		IHC— (Emboli)	7		
		IHC—	5		
Summe	77		77	19	23
IHC	n	HE	n		
Emboli	12	HE—	7		
		Verdacht	5	4	1
negativ	12	HE—	5		
		MIME	1		
		Verdacht	6		
positiv	53	MIME	16	5	11
		Verdacht	21	10	11
		HE—	16		
Summe	77		77	19	23

MIME=Mikrometastase; IHC=Immunhistochemie; HE=Hämatoxilin-Eosin; n=Anzahl

(69,8 %) in der HE-Färbung auch positiv (16 Mikrometastasen, 21 Verdachtsfälle), jedoch nur in 22 (41,5 %) Fällen befanden sich die Mikrometastasen in identischen Lymphknotenlokalisationen (11 Mikrometastasen, 11 Verdachtsfälle); allerdings wurden 14 Mikrometastasen der Größe II+ erkannt (5 sicher, 9 verdächtig).

16 Mikrometastasen wurden überhaupt nicht erkannt. Von 17 in der H.E.-Färbung sicher angesprochenen Mikrometastasen waren 16 immunhistochemisch positiv, wovon sich 11 in identischen Lymphknotenlokalisationen befanden. Von 32 Verdachtsfällen in der H.E.-Färbung waren 21 immunhistochemisch verifizierbar, davon 11 in identischen Lokalisationen, 5 stellten sich immunhistochemisch als Tumorzellemboli dar, davon nur 1 Fall mit identischer Lokalisation und 6 Fälle waren immunhistochemisch negativ. Von 28 HE-negativen Fällen

wiesen 16 Mikrometastasen und 7 Tumorzellemboli auf. Positive Reaktionen der Größe I+ allerdings wurden in keiner HE-Färbung erkannt.

Diskussion

Die Rassenverteilung in der vorliegenden Untersuchung deckt sich in etwa mit den Ergebnissen vergleichbarer Literatur: Auch in unserem Untersuchungsgut scheinen Terrier und Teckel überdurchschnittlich oft an Mammatumoren zu erkranken. Allerdings übertrafen Mischlinge Terrier und Teckel um 8 – 9 % und waren zumindest in dieser Untersuchung häufiger anzutreffen als in vergleichbaren Studien (u.v.a. Boldizsár et al. 1992; Bostock 1986; Dorn and Schneider 1976; Else and Hannant 1979; Eskens 1983; Mitchell et al. 1974; von Bomhard and Drejack 1977; von Sandersleben 1958), wobei im Berliner Sektionsgut Cocker Spaniel, Airedale-Terrier, Pudel und Mischlinge am häufigsten von Mammatumoren betroffen waren (siehe Kapitel 3.2.1). Das Gesamtdurchschnittsalter, mit dem die Hündinnen an Mammakarzinomen erkrankten, lag bei 9,2 Jahren und somit in dem Rahmen, der in der Literatur beschrieben ist (Boldizsár et al. 1992; Brodey, Goldschmidr, and Roszel 1983; Eskens 1983; Kurzman and Gilbertson 1986; Simon et al. 1996; von Bomhard and Drejack 1977); im Berliner Sektionsgut konnte allerdings ein höherer Altersdurchschnitt von 10,6 Jahren festgestellt werden (siehe Kapitel 3.2.1).

85,7 % der bei der Erstuntersuchung als metastasenfrei befundeten 77 Lymphknoten waren immunhistochemisch dennoch positiv, d.h. in ihnen war mindestens eine zytokeratinpositive Zelle enthalten. Immerhin 68,8 % der 77 Lymphknoten enthielten Mikrometastasen der Größe II+, III+ und IV+, 15,6 % Tumorzellemboli der Größe I+, 1,3 % ausschließlich Zytokeratin-positiv Makrophagen und nur 14,3% in keiner der drei Schnittebenen eine positive Reaktion. Die Tatsache, daß sorgfältiges Mikroskopieren, am besten von Serienschritten, bereits eine hohe Trefferquote sichert (Natsugoe, Aiko, and Shimazu 1991), konnte auch in dieser Untersuchung in 49 (63,6 %) Fällen bestätigt werden. Allerdings wurden auch Tumorzellen in Regionen vermutet, in denen der immunhistochemische Schnitt keine aufwies (26 Fälle), unabhängig ob letzterer positiv oder negativ befundet wurde. 16 Fälle wurden ohne Auffälligkeiten negativ gewertet, in denen immunhistochemisch Mikrometastasen enthalten waren. In 23 Fällen (41,6 %) stimmte die Diagnose beider Methoden überein. Allerdings waren in nur 11 (14,3 %) H.E.-gefärbten Lymphknoten eine sichere Diagnostik möglich: Bei diesen Zellverbänden handelte es sich in 5 Fällen um Zellverbände mit 3-50 Tumorzellen (Größe II+) und in 6 Fällen um mehr als 51 Tumorzellen (Größe III+ und IV+). In den übrigen Lymphknoten konnte lediglich ein Verdacht ausgesprochen werden. Schon Lennert (Georgii 1984) betonte, daß bei den Tumorzellen im H.E.-Schnitt die Verwechslungsgefahr mit Makro-

phagen sehr groß sei, weshalb im Zweifelsfall Ergebnisse immunhistochemisch verifiziert werden sollten. Damit erweist sich die Entnahme eines einzelnen Schnittes eines Lymphknotens als weniger erfolgreich: Daß in den zunächst als metastasenfrenen diagnostizierten Lymphknoten doch Metastasen bei der erneuten H.E.-Untersuchung befundet werden konnten, liegt mit Sicherheit an der weiteren gezielten Aufarbeitung des Materials. So muß für veterinärmedizinische Belange Ansichten (Galea et al. 1991) widersprochen werden, die einen einzelnen Lymphknotenschnitt bei der histopathologischen Untersuchung für ausreichend halten. Der Wert von seriellen Lymphknotenauswertungen ((Ludwig) Breast Cancer Study Group 1990; Gusterson and Ott 1990; Wilkinson and Hause 1974) kann nur betont werden. In vergleichbaren Studien beim Menschen konnten lediglich bei etwa 10–30 % der untersuchten Frauen immunhistochemisch okkulte Metastasen diagnostiziert werden (Apostolikas, Petraki, and Agnantis 1989; Galea et al. 1991; Kainz et al. 1993; Nasser et al. 1993; Raymond and Leong 1989; Ronay, Tomesch, and Tulusan 1989). Diese Zahlen beziehen sich allerdings auf Personen und nicht auf Lymphknoten, da beim Mensch pro Fall mindestens drei Lymphknoten untersucht werden. Da eine okkulte Metastase in einem Lymphknoten pro Patientin ausreicht, um einen positiven Befund zu erhalten, sind die Zahlen okkulten Metastasen in den einzelnen Lymphknoten möglicherweise viel höher.

Tumorzellemboli und kleinere Mikrometastasen finden sich am häufigsten im Sinusraum. Wobei festzuhalten ist, daß je größer die Tumorzellansammlungen waren, desto gleichmäßiger verteilten sich die Metastasen im ganzen Lymphknoten, und desto stärker war das Parenchym betroffen. Vergleichbares wird für den Menschen berichtet (Grundmann 1984; Liotta 1992; Natsugoe, Aiko, and Shimazu 1991; Wallace, Josephson, and Hollenberg 1980).

Erstaunlicherweise scheinen invasive und expansive Karzinome annähernd gleich häufig zu metastasieren, wobei invasive Adenokarzinome häufiger metastasierten als invasive solide Karzinome (81,5 % zu 66,6 %). Das spiegelt sich auch bei Tumoren wieder, die sowohl einen invasiven als auch einen expansiven Anteil aufwiesen. Karzinome mit einem invasiven adenokarzinomatösen Anteil metastasierten weitaus mehr als Karzinome, deren adenokarzinomatöser Anteil expansiv wuchs (83,3 % zu 50 %). Bei den expansiven Karzinomen ist das Verhältnis genau umgekehrt. Hier fanden sich in Lymphknoten von expansiven Adenokarzinomen seltener Tumorzellen als in denen von expansiven soliden Karzinomen. Diese Metastasierungshäufigkeit wird nicht nur in der humanmedizinischen Literatur expansiven Karzinomen weitgehendst abgesprochen (Bostock 1986; Fidler, Gerstein, and Hart 1978; Fidler and Hart 1982; Gilbertson et al. 1983; Liotta 1986; Liotta 1992; Misdorp and Hart 1976; Misdorp and Hart 1979a), obgleich diese Befunde nicht immunhistochemisch evaluiert worden sind. In Anbetracht der Tatsache, daß mehr als 60 Prozent aller Karzinome

der vorliegenden Untersuchung metastasiert hatten – nicht einberechnet die 14,3 % der Lymphknoten, die Reaktionen der Größe I+ zeigten – muß einer sorgfältigen Lymphknotendiagnostik des Hundes mehr Gewichtung beigemessen werden. Auffassung, die Lymphknotenmetastasen einen erheblichen Einfluß auf erneutes Tumorwachstum und auf eine geringe Überlebenszeit zuordnen (Bostock 1986; Gilbertson et al. 1983; von Sandersleben 1968; Yamagami et al. 1996), kann daher voll zugestimmt werden, da auch in der humanmedizinischen Literatur kein Zweifel darüber herrscht, daß Patientinnen mit metastasennegativen Lymphknoten wesentlich bessere Überlebenschancen aufweisen ((Ludwig) Breast Cancer Study Group 1990; Clayton and Hopkins 1993; Fisher et al. 1983).

Der prognostische Wert des immunhistochemischen Nachweises von Tumorzellemboli und kleineren okkulten Mikrometastasen wird allerdings häufig bezweifelt (Kainz et al. 1993; Mitra and MacRae 1991; Nasser et al. 1993; Sartin et al. 1992). Da zum Zeitpunkt der klinischen Vorstellung eines Patienten die Möglichkeit besteht, daß bereits Metastasen vorhanden sind (Kohn 1993), muß jeder Hinweis – und sei es nur ein Tumorzellembolus – sehr ernst genommen werden. Allerdings könnten andere Kriterien als okkulte Lymphknotenmetastasen prognostisch bedeutsamer sein, wie zum Beispiel peritumorale Gefäßeinbrüche (Gutberlet and Rudolph 1994; Nasser et al. 1993) oder Proliferationsrate und DNA-Polyploidie (Bratulic et al. 1996; Hellmén et al. 1993; Perez Alenza et al. 1995). Bis zur endgültigen Abklärung der prognostischen Relevanz von Geschwulstzellemboli und Mikrometastasen in regionären Lymphknoten beim Mammakarzinom ist jedoch unbedingt festzuhalten, daß bereits eine ohne großen Aufwand zu realisierende Lymphknotenuntersuchung an Serienschnitten eine erhebliche Steigerung der Erkennungsrate bedeutet (Nasser et al. 1993; Natsugoe, Aiko, and Shimazu 1991), die nur durch eine immunhistochemische Verifizierung übertroffen werden kann.

Literatur

- (Ludwig) Breast Cancer Study Group, International. 1990. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancer. *Lancet* 335:1565-1568.
- Allen, S. W., and E. A. Mahaffey. 1989. Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. *Journal of the American Animal Hospital Association* 25:540-546.
- Apostolikas, N., C. Petraki, and N.J. Agnantis. 1989. The reliability of histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer. Preliminary report. *Pathology, Research and Practice* 184:35-38.

- Bastianello, S.S. 1983. A survey on neoplasie in domestic species over a 40-year period from 1953 to 1974 in Republic of South Afrika. VI. Tumours occuring in dogs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 50:199-250.
- Boldizsár, H., O. Szenci, Muray T., and J. Csenki. 1992. Studies on canine mammary tumours. I. Age, seasonal and breed distribution. *Acta Veterinaria Hungarica* 40:75 - 87.
- Bostock, D.E. 1986. Canine and feline mammary neoplasms. *British Veterinary Journal* 142:506-514.
- Bratulic, M., Z. Grabarevic, B. Artukovic, and D. Capak. 1996. Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus - prognostic value in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 33:527-532.
- Brodey, R.S., M.H. Goldschmidr, and J.R. Roszel. 1983. Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19:61-90.
- Clayton, F., and C.L. Hopkins. 1993. Pathologic correlates of prognosis in lymph node-positive breast carcinomas. *Cancer* 71:1780-1790.
- Cordell, J.L., B. Falini, W.N. Erber, A.K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K.A.F. Pulford, H. Stein, and D.Y. Mason. 1984. Immunoencymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32:219 - 229.
- Dorn, C.R., and R. Schneider. 1976. Inbreeding and canine mammary cancer: a retrospective study. *Journal of the National Cancer Institute* 57:545 - 548.
- Dorn, C.R., O.N. Taylor, F.L. Frye, and H.H. Hibbard. 1968a. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *Journal of the National Cancer Institute* 40:295 - 305.
- Dorn, C.R., O.N. Taylor, R. Schneider, H.H. Hibbard, and M.R. Klauber. 1968b. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* 40:307 - 318.
- Else, R.W., and D. Hannant. 1979. Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Veterinary Record* 104:296-304.
- Eskens, U. 1983. Statistische Untersuchungen nach den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifizierte Geschwülste des Hundes unter besonderer Berücksichtigung der Mamma- und Hauttumoren. Inaugural-Dissertation, FB Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Ferguson, H.R. 1985. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 15:501-511.
- Fidler, I.J., D.A. Abt, and R.S. Brodey. 1967. The biological behavior of canine mammary neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 151:1311-1315.
- Fidler, I.J., D.M. Gerstein, and I.R. Hart. 1978. The biology of cancer invasion and metastasis. *Advances in Cancer Research* 28:149 - 2950.

- Fidler, I.J., and I.R. Hart. 1982. Biological diversity in metastatic neoplasms: Origins and implications. *Science* 217:998 - 1003.
- Fisher, B., M. Bauer, D.L. Wickerham, C.K. Redmond, and E.R. Fisher. 1983. Relation of number of positive nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. *Cancer* 52:1551-1557.
- Galea, M.H., E. Athanassiou, J. Bell, B. Dilks, J.F.R. Robertson, C.W. Elston, R.W. Blamey, and I.O. Ellis. 1991. Occult regional lymph node metastases from breast carcinoma: immunohistological detection with antibodies CAM 5.2 and NCRC-11. *Journal of Pathology* 165:221-227.
- Georgii, A. (Leitung). 1984. Rundtischgespräch über die diagnostischen Probleme der Metastasierung. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 68:164-185.
- Gilbertson, S.R., I.D. Kurzman, R.E. Zachrau, A.I. Hurvitz, and M.M. Black. 1983. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology* 20:127-142.
- Grundmann, E. 1984. Die lymphogene Metastasierung. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 68:33-46.
- Gusterson, B.A., and R. Ott. 1990. Axillary lymph node micrometastases from breast cancer (Letter). *Lancet* 336:434-435.
- Gutberlet, K., and R. Rudolph. 1994. Immunohistochemical identification of vessels in cancer cell invasion in canine mammary tumours. *European Journal of Veterinary Pathology* 1:11-14.
- Hellmén, E., R. Bergström, L. Holmberg, I.-B. Spangberg, K. Hansson, and A. Lindgren. 1993. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology* 30:20-27.
- Kainz, C., G. Gitsch, A. Lee, L. Danihel, and G. Breitenecker. 1993. Infiltrating lobular breast carcinoma: detection of occult regional lymph node metastasis by immunohistochemistry. *Anticancer Research* 13:74-74.
- Kohn, E.C. 1993. Development and prevention of metastasis. *Anticancer Research* 13:2553-2559.
- Kurzman, I. D., and S. R. Gilbertson. 1986. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 1:25-32.
- Liotta, L.A. 1986. Tumor invasion and metastases - role of the extracellular matrix: Rhoads memorial lecture. *Cancer Research* 46:1-7.
- Liotta, L.A. 1992. Cancer cell and metastasis. *Scientific American* 266:54-59; 62-63.
- Liotta, L.A., P.S. Steeg, and W.G. Stetler-Stevenson. 1991. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64:327 - 336.
- MacVean, D.W., A.W. Monlux, P.S. Anderson, S.L. Silberg, and J.F. Roszel. 1978. Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology* 15:700 - 715.

- Mialot, M., and M Lagadic. 1990. Epidémiologie descriptive des tumeurs du chien et du chat. *Recueil de Médecine Vétérinaire*:937 - 947.
- Misdorp, W., and A.A.M. Hart. 1976. Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 56:779-786.
- Misdorp, W., and A.A.M. Hart. 1979a. Canine mammary cancer: prognosis. *Journal of Small Animal Practice* 20:385-394.
- Misdorp, W., and A.A.M. Hart. 1979b. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* 62:537-545.
- Mitchell, L., F. A. de la Iglesia, M. S. Wenkoff, A. A. van Dreumel, and G. Lumb. 1974. Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *Canadian Veterinary Journal*:131-138.
- Mitra, I., and K.D. MacRae. 1991. A meta-analysis of reported correlations between prognostic factors in breast cancer: does axillary lymph node metastasis represent biology or chronology? *European Journal of Cancer* 27:1574-1583.
- Nasser, I.A., A.K. Lee, S. Bosari, R. Saganich, G. Heatley, and M.L. Silverman. 1993. Occult axillary lymph node metastases in „node-negative” breast carcinoma. *Human Pathology* 24:950-957.
- Natsugoe, S., T. Aiko, and H. Shimazu. 1991. A detailed histological study on occult metastasis of the lymph nodes. *Japanese Journal of Surgery* 21:528-532.
- Owen, L. N. 1979. A comparative study of canine and human breast cancer. *Investigative & Cell Pathology* 2:257-75.
- Pantel, K., H. Koprowski, and G. Riethmüller. 1993. Meeting report: Conference on cancer micrometastasis: Biology, methodology and clinical significance. *International Journal of Oncology* 3:1019.
- Perez Alenza, M. D., G. R. Rutteman, N. J. Kuipers Dijkshoorn, L. Pena, A. Montoya, W. Misdorp, and C. J. Cornelisse. 1995. DNA flow cytometry of canine mammary tumours: the relationship of DNA ploidy and S-phase fraction to clinical and histological features. *Research in Veterinary Science* 58:238-243.
- Raymond, W.A., and A.S.Y. Leong. 1989. Immunoperoxidase staining in the detection of lymph node metastasis. *Pathology* 21:11-15.
- Ronay, G., A. Tomesch, and A.H. Tulusan. 1989. Mikrometastasen in axillären Lymphknoten beim Mammakarzinom. Eine immunhistochemische Untersuchung. *Pathologie* 10:289-293.
- Sartin, E. A., S. Barnes, R. P. Kwapien, and L. G. Wolfe. 1992. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 53:2196-2200.
- Schneider, R. 1970. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 26:419 - 426.
- Simon, D., P. Goronzy, I. Stephan, A. Meyer Lindenberg, M. Aufderheide, and I. Nolte. 1996. Mammatumoren beim Hund: Untersuchung zu Vorkommen und Verlauf der Erkrankung. *Praktische Tierarzt* 77.

- Stosiek, P., M. Kasper, U. Karsten, and R. Goertchen. 1991. Detection of cancer metastases in regional lymph nodes: comparative histological and immunohistological investigations with the broad-range anticytokeratin monoclonal antibody A45-B/B3. *Neoplasma* 38:43-47.
- von Bomhard, D., and J. Dreiack. 1977. Statistische Erhebung über Mammatumoren bei Hündinnen. *Kleintierpraxis* 22:205 - 209.
- von Sandersleben, J. 1958. Beitrag zur Frage der Malignität der Mammatumoren des Hundes. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 11:191-198.
- von Sandersleben, J. 1968. Die malignen Mammatumoren der Hündin unter besonderer Berücksichtigung ihrer Prognose. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B* 15:111-115.
- von Sandersleben, J., E. Schäffer, and J. Weisse. 1973. Erkrankungs- und Todesursachen des alternden Hundes aus der Sicht der Sektionsstatistik. *Kleintierpraxis* 18:25-26, 28, 30-32.
- Wallace, A.C., R.L. Josephson, and N.K. Hollenberg. 1980. Observations on lymph node metastases. In *Metastatic Tumor Growth.*, edited by E. Grundmann. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Weiss, L., J. Bronk, J.W. Pickren, and W.W. Lane. 1981. Metastatic patterns and target organ arterial blood flow. *Invasion & Metastasis* 1:126 - 135.
- Wilkinson, E.J., and L. Hause. 1974. Probability in lymph node section. *Cancer* 33:1269-1274.
- Yamagami, T., T. Kobayashi, K. Takahashi, and M. Sugiyama. 1996. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *Journal of Veterinary Medical Science* 58:1079-1083.

4.5 Zytokeratine caniner primärer Leberkarzinome

Einleitung

Primäre Neoplasien der Leber werden beim Hund nur selten gesehen (Bastianello 1983; Geisel et al. 1990; Geisenberger 1990; Hammer and Sikkema 1995; Hayes, Morin, and Rubenstein 1983; Kusch 1985; Patnaik, Hurvitz, and Lieberman 1980; Patnaik et al. 1981a; Patnaik et al. 1981c; Trigo et al. 1982; von Sandersleben, Schäffer, and Weisse 1973); ihre Inzidenz in definierten Populationen liegt mit 1,6 Fällen pro 100.000 Hunden (MacVean et al. 1978) ausgesprochen niedrig. In der Regel bereiten diese Neoplasien keine diagnostischen Probleme; einige dieser Tumoren können allerdings aufgrund ihres pleomorphen Erscheinungsbildes (Patnaik et al. 1981a; Patnaik et al. 1981b; Patnaik et al. 1981c) diagnostische Schwierigkeiten bereiten. Um typische Leberkarzinom-Merkmale festzustellen, soll mit dieser Arbeit versucht werden, ein Zytokeratinmuster für hepatogene Karzinome zu erstellen. Beim Menschen gilt, daß Hepatozyten das Zytokeratinpaar 8/18, das Gallengangsepithel die Zytokeratine 8/18 und 7/19 exprimieren (Moll et al. 1982; Stosiek, Karsten, and Kasper 1987). Zusätzlich wird bei der Ratte Zytokeratin 20 in cholangiären Epithelien gefunden (Moll, Schiller, and Franke 1990). Da das onkofetale Antigen - Fetoprotein (AFP) als spezifischer Marker für hepatozelluläre Neoplasien gilt (Gitlin and Boesman 1967; Martin de las Mulas et al. 1995), wurde zusätzlich die Expression von AFP ermittelt.

Material und Methoden

Leberproben von 10 lebergesunden, unmittelbar nach der Euthanasie seziierten Hunden wurden einer SDS-Polyacrylamidgelanalyse mit anschließendem Immunblot unterzogen: 2 Boxer (weibl./ 2,5 Jahre; männl./4 Jahre), 2 Deutsche Schäferhunde (weibl./3 Jahre; männl./adult, 2 Cockerspaniel (weibl./4 Jahre; männl./3 Jahre), 2 Yorkshire-Terrier (weibl./6 Jahre; männl./1,5 Jahre), und 2 Bastarden (weibl./adult; männl./7 Jahre). Nach der Entnahme einer würfelförmigen Probe von einer Kantenlänge etwa 1 cm aus dem Leberparenchym (ohne Kapselanteile) wurden diese zunächst tiefgefroren und dann daraus analog den Anweisungen von Achtstaetter et al. (1986) die Zytokeratinfraktion gewonnen: Das aufbereitete Material wurde im doppelten Ansatz einer eindimensionalen Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) nach der Standardmethode von Laemmli (1970) unterzogen. Dazu wurde ein 12,5%iges Gel, gegossen aus Acrylamid und Bisacrylamid in einem Verhältnis von 200:1, eingesetzt. Bei jedem Gel-Lauf wurden jeweils 5 Proben und ein Molekulargewichtsmarkergemisch (Dalton Marker VII-L; Fa. Sigma, Deisenhofen) aufgebracht. Ein Gel wurde jeweils

mit Coomassie Blue gefärbt, mehrere Stunden entfärbt und anschließend mit einem Scanner (Scanjet II cx, Fa. Hewlett Packard) digitalisiert. Die aufgetrennten Proteine des zweiten (ungefärbten) Gels wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (Millipore Filters, Typ HAmit 0,45 µm Porengröße) in einer Blotkammer elektrotransferiert (Towbin, Staehlin, and Gordon 1979). Zum spezifischen Zytokeratinnachweis wurden die Membranstreifen bei Raumtemperatur zunächst mit 3% BSA in TRIS-HCl Puffer inkubiert, mehrmals gewaschen und mit den Antikörpern (Tabelle 4.5-1) für 18 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Anti-Maus-Konjugat aus der Ziege, das mit Alkalischer Phosphatase markiert ist (# M 30008, Fa. Medac, Hamburg) zugegeben und die Visualisierungsreaktion mit 0,6 mg/ml Fast Red Salz/0,4 mg/ml Naphthol AS-MX Phosphat/ TRIS-HCl Puffer (0,2 M, pH 8,0) durchgeführt. Nach dem Trocknen wurden die Ergebnisse mit einem HP Scanjet II cx digitalisiert. Die digitalisierten Ergebnisse wurden auf einem Macintosh-Computer (Quadra 660 AV) mit Hilfe des Public Domain-Programms NIH Image (entwickelt vom U.S. National Institutes of Health, erhältlich im Internet bei <http://rsb.info.nih.gov/-nih-image/>) ausgewertet.

Zweiunddreißig hepatozelluläre Karzinome (15 hepatozelluläre Karzinome, 15 cholangiäre Karzinome und zwei gemischtzellige Karzinome [hepatozellulär und cholangiär]) aus dem Obduktionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der FU Berlin aus den Jahren 1980 bis 1997 wurden untersucht. Die Proben waren routinemäßig in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Die Immunhistochemie wurde mit einer breiten Palette von Antikörpern (Tabelle 4.5-1) als leicht modifizierte APAAP-Technik (Cordell et al. 1984) durchgeführt. Die APAAP-Reagenzien entstammten einem APAAP-Kit (# ADS 101; Dianova, Hamburg). Entparaffinierte, etwa 5 µm dicke Schnitte wurden in einem Mikrowellenherd erhitzt (2 x 5 min. bei 600 W in 10mM Zitratpuffer, pH 6,0) und nach Spülen in TRIS-Puffer auf Coverplates® (Fa. Shandon, Frankfurt/Main) montiert. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit den in RPMI verdünnten primären Antikörpern inkubiert, anschließend der sekundäre Antikörper (1:100 verdünnt in RPMI mit Zusatz von 5 % normalen Hundeserum) aufgebracht und nach Zusatz des APAAP-Komplexes mit Hilfe der Substrat-(Naphthol-AS-MX-Phosphat gelöst in N,N, Dimethylformamide unter Zusatz von 1M Levamisole)-Fast Red Lösung (Sigma, Deisenhofen) visualisiert. Im Falle des polyklonalen -Fetoproteins wurde nach dem ersten Antikörper zusätzlich ein Mouse-Anti-Rabbit-Antikörper aufgetragen („Mousification“). Als Negativkontrollen wurden Konsekutivschnitte herangezogen, bei denen der primäre Antikörper durch ein nichtimmunogenes Mausserum (Control IgG; Dianova, Hamburg), im Falle des AFP durch ein nichtimmunogenes Kaninchenserum (Rabbit Immunglobulin Fraktion; Dako, Hamburg), ersetzt wurden.

Die Immunreaktionen wurden semiquantitativ ausgewertet: Der relative Anteil von immunreaktiven Zellen wurde mikroskopisch in 10 Gesichtsfeldern bei 250facher Vergrößerung bestimmt und wie folgt „gescored“:

- [—]: keine immunreaktive Zellen,
- [1+]: 10 % immunreaktive Zellen
- [2+]: 11–50 % immunreaktive Zellen
- [3+]: 51–75 % immunreaktive Zellen oder
- [4+]: 75 % immunreaktive Zellen.
- a blaßrosafarbene Färbeintensität
- b leuchtend rosarote Färbeintensität
- c kräftige, leuchtend-rote Färbeintensität.

Eine [1+] Färbung wurde als insuffizient gewertet.

Ergebnisse

Im SDS-PAGE und im Western Blot lassen sich in allen Proben die Zytokeratine 8, 18, 7 und 19 nachweisen (Abbildung 4.5-1).

Die immunhistochemischen Ergebnisse faßt Tabelle 4.5-2 zusammen.

Nur 53,3 % aller hepatozellulärer Karzinome, unabhängig von ihrem morpholo-

Tabelle 4.5-1
Antikörper für APAAP und Western Blot

Antikörper	Spezifität	Verdünnung APAAP	Verdünnung Western Blot	Bezugsquelle
AE1	CK 10,14,16,19	1:400	1:1000	ICN
AE3	CK 1, 5, 8	1:400	1:1000	ICN
KL1	CK 10/11	1:100	1:1500	Immunotech
CAM 5.2	CK 8/18	ready to use	1:10	Becton Dickinson
Ks 7.18	CK 7	1:50	1:1000	Progen
E3	CK 17	1:20	1:400	Dako
Ks 19.1	CK 19	1:10	1:200	Progen
CK 20	CK 20	1:10	1:100	PD Dr. R. Moll, Mainz
Rabbit Anti -1-Feto- protein	-1-Fetoprotein	1:300	—	Dako

gischem Erscheinungsbild, exprimierten CAM 5.2 (Zytokeratinpaar 8/18) in [4+]c-Quantität (Abbildung 4.5-2), während es in 80 % aller cholangiären Karzinomen nachweisbar war. Überraschenderweise gab es bei der Reaktivität der unveränderten Hepatozyten eine azinär unterschiedliche Anfärbbarkeit: Zone I zeigte eine [4+]c-Reaktion, während im übrigen Azinus eine [4+]a-Reaktion festgestellt werden konnte. Die Gallengänge und deren Neoplasien reagierten einheitlich [4+]c.

AE1 war in allen untersuchten Gallengangskarzinomen (Abbildung 4.5-3) und in allen gemischtzelligen Karzinomen in Form einer [4+]c-Reaktion präsent, während es nur in 13,3 % der Leberzellkarzinome als [2+]c immunreaktiv war.

CK 7 (Ks 7.18) war nur bei einem, CK 19 (Ks 19.1) bei 4 (26,7 %) Gallengangskarzinomen mit jeweils [3+]c-Reaktionen nachweisbar.

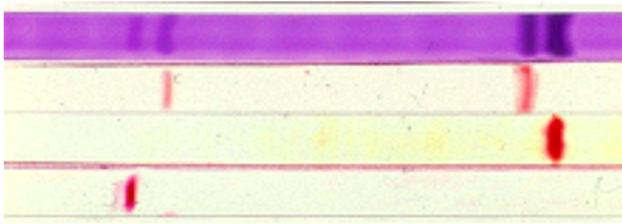
AE3 reagierte insgesamt in 26,7 % aller Leberzellkarzinomen; zweimal mit einer [2+]c- und zweimal mit einer [3+]c-Färbung. Bei einem cholangiären Karzinom konnte AE3 als [2+]c-Reaktion nachgewiesen werden.

KL1, E3 und CK 20 reagierten in keinem Fall.

AFP konnte in 46,7 % aller hepatozellulären Karzinome in unterschiedlichen Quantitäten gefunden werden: Einmal eine [3+]c-, und sechsmal eine [2+]c-Reaktion (Abbildung 4.5-4).

In Kombination ergaben sich folgende Färbungen:

Hepatozelluläre Karzinome: 1 CAM 5.2. und AE1 positiv
1 CAM 5.2, AE1 und AE3 positiv
3 CAM 5.2 und AE3 positiv
3 CAM 5.2 und AFP positiv

**Abbildung 4.5-1**

SDS-PAGE und Western Blot von normaler Leber. Laufrichtung war von rechts nach links. Dargestellt von oben nach unten: CK 19, CK 7, CK 8/18, Gel. Im Immunblot von CK 19 taucht unterhalb der Hauptbande eine Nebenbande auf; die wahrscheinlich ein Degradierungsprodukt von CK 19 ist.

4 nur AFP positiv
3 negativ

Cholangiäre Karzinome:

5 nur AE1 positiv
1 CAM 5.2, AE1 und AE3 positiv
5 CAM 5.2 und AE1 positiv
1 CAM 5.2, Ks 7.18, Ks 19.1 und AE1 positiv
3 CAM 5.2, Ks 19.1 und AE1 positiv

Kombinationstumore:

2 nur AE1

Diskussion

Mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot konnte gezeigt werden, daß der Leberbesatz an Zytokeratinen beim Hund dem des Menschen (Moll et al. 1982) entspricht. Allerdings war nicht in allen untersuchten Karzinomen diese Zytokeratinausstattung immunhistochemisch weiterhin nachweisbar.

Zytokeratin 8/18 als typisches Zytokeratinpaar von Leber und Gallengängen war häufiger in Gallengängen als in Leberzellen darstellbar. Offensichtlich hat

Tabelle 4.5-2
Ergebnisse der APAAP-Färbungen

Antikörper	Hepatozelluläre Ca n=15	Cholangiäre Ca n=15	Gemischtzellige Ca n=2
AE1	2/15	15/15	2/2
AE3	4/15	1/15	0/2
KL1	0/20	0/15	0/2
CAM 5.2	8/15	10/15	0/2
Ks 7.18	0/15	1/15	0/2
E3	0/15	0/15	0/2
Ks 19.1	0/15	4/15	0/2
CK 20	0/15	0/15	0/2
AFP	7/15	0/15	0/2

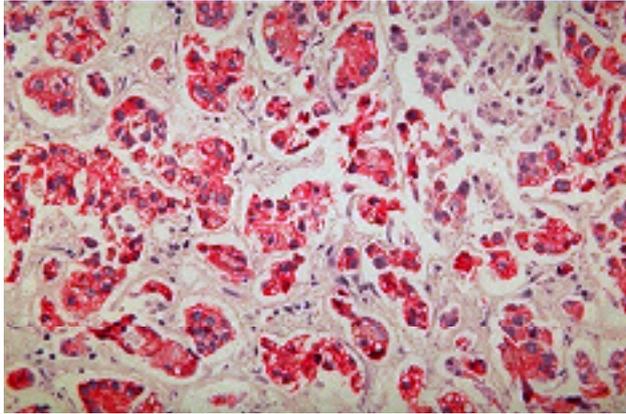


Abbildung 4.5-2
Hepatozelluläres Karzinom. CAM 5.2.
(CK 8/18), APAAP

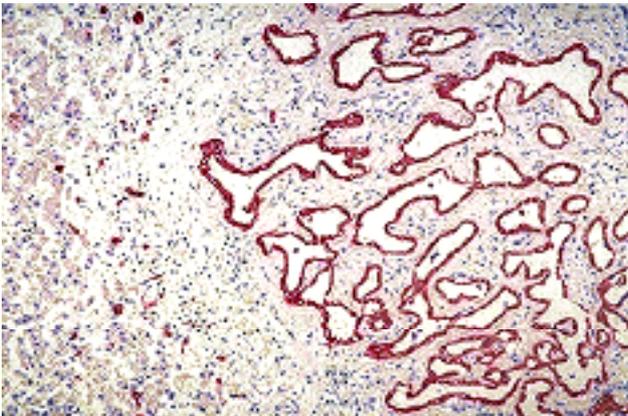


Abbildung 4.5-3
Intrahepatisches cholangiäres Karzinom.
AE1, APAAP

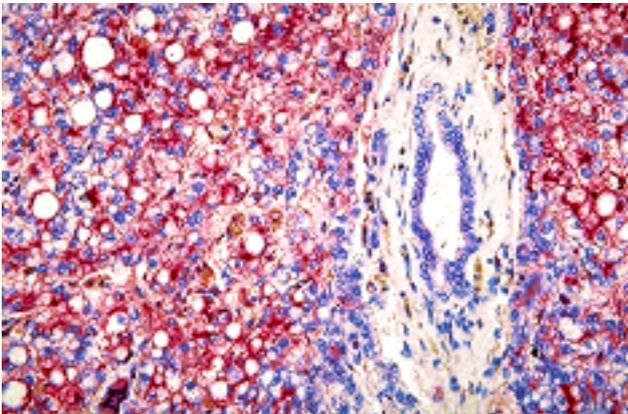


Abbildung 4.5-4
Leberzellkarzinom. –Fetoprotein,
APAAP

die Formalinfixierung – trotz Mikrowellenvorbehandlung – dabei einen Teil der Anfärbbarkeit verhindert. Da Gallengänge einen deutlich dichteren Besatz an Intermediärfilamenten aufweisen (Chedid, Spellberg, and De Beer 1974; Sternlieb 1965), reagieren diese daher auch häufiger.

Die intensivere Anfärbbarkeit der Zone I-Hepatozyten mit CAM 5.2. (CK 8/18) wird bereits in der Erstbeschreibung des Antikörpers erwähnt (Makin, Bobrow, and Bodmer 1984) und tritt besonders deutlich in formalinfixierten Proben auf.

Als ausgesprochen konstanter Marker für Karzinome mit cholangiären Charakter erwies sich AE1; das gilt auch für entsprechende Neoplasien beim Menschen (Johnson et al. 1988). Mit AE1 gelang es alle cholangiären Entartungen sicher zu markieren. Daher empfiehlt sich in Zweifelsfällen (beispielsweise: pseudoglanduläres hepatozelluläres Karzinom vs. Cholangiokarzinom) AE1 zur Differentialdiagnosenfindung einzusetzen. Problematisch bleibt allerdings, daß Karzinometastasen in die Leber (beispielsweise von Mammatumoren) auch AE1 positiv sind.

-Fetoprotein (AFP), das physiologischerweise nur während der Embryonalentwicklung der Leber exprimiert wird (Gitlin and Boesman 1966), zeigt bei maligner Entartung eine Neoexpression, die es als Marker für hepatozelluläre Neoplasien interessant macht (Wu and Sell 1990), zumal AFP auch serologisch bei Hunden nachgewiesen werden kann (Hahn and Richardson 1995; Lowseth et al. 1991; Shibata and Yamanaka 1988). Allerdings reagierten in dieser Untersuchung nur 46,7 % aller Leberzellkarzinomen mit dem AFP-Antikörper. Das sind zwar deutlich mehr als die 27,3 %, die Martin de las Mulas et al. (1995) berichten, reicht aber nicht aus, um AFP als sensitiven und sicheren Marker einzusetzen. Auch in der humanmedizinischen Literatur wird AFP als nichtsensitiver Marker betrachtet (Hurliman and Gardiol 1991), wobei der Prozentsatz der Reaktivität bei Leberzelltumoren des Menschen von 2 % (Ferrandez-Izquierdo and Llombart-Bosch 1987) bis zu 70 % (Kojiro et al. 1981) reicht. Da AFP aber auch in anderen Neoplasien beim Menschen (z.B. Dottersacktumoren, Neoplasien des Gastrointestinaltraktes) exprimiert werden kann, wird seine Eigenschaft als genereller (serologischer) Tumormarker zwar betont, aber als nicht eindeutig leberspezifisch bewertet (Lamerz 1997). Beim Hund kann die Kombination CAM 5.2. und AFP in vielen Fällen ein eindeutiges Ergebnis erbringen. Zumindest in dieser Untersuchung waren alle hepatozellulären Neoplasien mit einem und/oder beiden Antikörpern markierbar.

Letztendlich bleibt festzuhalten, daß es zwar gelingt, immunhistochemisch hepatozelluläre von cholangiären Neoplasien zu differenzieren, daß es aber in Zweifelsfällen unmöglich erscheint nur aufgrund der Immunreaktionen, Karzinometastasen von cholangiären Neoplasien zu differenzieren.

Literatur

- Achtstaetter, T., M. Hatzfeld, R.A. Quinlan, D.C. Parmelee, and W.W. Franke. 1986. Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods in Enzymology* 134:355 - 371.

- Bastianello, S.S. 1983. A survey on neoplasie in domestic species over a 40-year period from 1953 to 1974 in Republic of South Afrika. VI. Tumours occuring in dogs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 50:199-250.
- Cordell, J.L., B. Falini, W.N. Erber, A.K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K.A.F. Pulford, H. Stein, and D.Y. Mason. 1984. Immunoencymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32:219 - 229.
- Geisel, O., S. Kusch, M. Geisenberger, and W. Hermanns. 1990. The incidence of malignant neoplasms of the dog in a 40-year period (1950-1989) in Munich. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 132:429.
- Geisenberger, M. 1990. Erhebungen über das Vorkommen bösartiger Tumoren beim Hund anhand der Sektionsstatistik des Instituts für Tierpathologie, München, 1951-1969. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hammer, A. S., and D. A. Sikkema. 1995. Hepatic neoplasia in the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 25:419-435.
- Hayes, H. M., Jr., M. M. Morin, and D. A. Rubenstein. 1983. Canine biliary carcinoma: epidemiological comparisons with man. *Journal of Comparative Pathology* 93:99-107.
- Kusch, Susanne. 1985. Erhebungen über das Vorkommen bösartiger Blastome beim Hund anhand der Sektionsstatistik des Institutes für Tierpathologie, München, 1970-1984. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680 - 685.
- Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, and P.H. Lieberman. 1980. Canine hepatic neoplasms: a clinicopathologic study. *Veterinary Pathology* 17:553-564.
- Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, P.H. Liebermann, and G.F. Johnson. 1981a. Canine bile duct carcinoma. *Veterinary Pathology* 18:439-444.
- Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, P.H. Liebermann, and G.F. Johnson. 1981b. Canine hepatic carcinoids. *Veterinary Pathology* 18:445-453.
- Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, P.H. Liebermann, and G.F. Johnson. 1981c. Canine hepatocellular carcinoma. *Veterinary Pathology* 18:427-438.
- Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.
- Trigo, F.J., H. Thompson, R.G. Breeze, and A.S. Nash. 1982. The pathology of liver tumours in dogs. *Journal of Comparative Pathology* 92:21-37.
- von Sandersleben, J., E. Schäffer, and J. Weisse. 1973. Erkrankungs- und Todesursachen des alternden Hundes aus der Sicht der Sektionsstatistik. *Kleintierpraxis* 18:25-26, 28, 30-32.

5 Diskussion

Zur Diskussion der Einzelergebnisse sei auf die Kapitel 4.1 bis 4.5 verwiesen. Im Folgenden soll Gemeinsames zusammenfassend kurz dargestellt und diskutiert werden.

Neoplasien stellen – zumindest aus der Sicht des Pathologen – mit die häufigste Todesursache beim Hund (siehe Kapitel 4.1) dar, wobei die Frage nach Ursachen bislang ungeklärt bleibt. Die prädisponierende Rolle von Papillomaviren für verschiedene Karzinomen, speziell solcher der Haut und Schleimhäute, scheint in der Humanonkologie gesichert zu sein (z.B.: Rohwedder et al. 1997; Sugerman and Shillito 1997; zur Hausen 1996); beim Hund liegen nur unzureichende Verdachtsmomente über die Rolle der Papillomaviren vor (siehe Kapitel 4.3.3).

Die Tatsache, daß etwa ein Viertel aller Hundesektionen zur Diagnose „Neoplasie“ kommt, macht überdeutlich, daß Etablierung und Ausbau einer veterinärmedizinischen Onkologie dringend notwendig ist. Eine elementare Voraussetzung für eine erfolgreiche veterinärmedizinische Onkologie wäre allerdings, daß spezifische Therapieprotokolle für distinkte Tumorentitäten zur Verfügung stehen. Das setzt wiederum voraus, daß der Pathologe eine definitive Diagnose zu erstellen vermag. Bei schätzungsweise 80 % aller diagnostischen Tumoreinsendungen dürfte die Erstellung einer definitiven Diagnose keine Probleme bereiten. Bei etwa 10-15 % aller Einsendungen ist allerdings Diskussionsbedarf vorhanden und etwa 1-5 % aller Fälle sind nicht endgültig abklärbar. Für diese 20 % „Problemfälle“ kann ein immunhistochemisches Tumortyping diagnostische Hilfestellung leisten.

Problematischer ist, daß die Intermediärfilamente zwar phylogenetisch weit gestreut vorkommen, aber dennoch speziesspezifische Unterschiede aufweisen können. Insbesondere konnte in dieser Arbeit am Beispiel von Mamma und Leber des Hundes gezeigt werden, daß auf der Intermediärfilamentebene (proteinbiochemisch betrachtet) ein naher Verwandtschaftsgrad zum Menschen besteht. Diese Tatsachen sollten spontane Neoplasien des Hundes als Modellfall für gleichartige Tumorentitäten beim Menschen für Onkologen interessant machen, und somit ein interdisziplinäres Zusammenarbeiten von human- und veterinärmedizinischen Onkologen forcieren.

Aber – und auch das zeigten unsere Untersuchungen – existieren einige epidermale „Besonderheiten“ beim Hund. Neben offensichtlich weit verbreiteten Zytokeratin-Polymorphismen in der caninen Epidermis überrascht die Expression von Zytokeratins 6 (siehe Kapitel 4.3.1). Vergleiche mit anderen Spezies (Pferd, Katze, Huhn, Mensch; eigene nicht publizierte Beobachtungen) bestätigen diese doch unerwartete Reaktivität: Zytokeratin 6, immunhistochemisch verifiziert durch LP 34-Reaktivität bei gleichzeitiger negativer Reaktion von Ks 18.04 (CK 18) und CAM 5.2. (CK 8/18), läßt sich nur beim Hund in unveränderter Epidermis nachweisen. Bei Pferd, Katze, Huhn und Mensch ist dies nicht der Fall; lediglich Zellen der äußeren Wurzelscheide (resp. des Federbalgs) exprimieren bei diesen Spezies CK 6.

Ein Hauptziel dieser Schrift bestand auch darin, durch den Einsatz immunhistochemischer und biochemischer Methoden mit Hilfe kommerziell erhältlicher Antikörper, ein möglichst detailliertes Bild der Expressionsmuster caniner epithelialer Neoplasien zu erhalten, das für unklare Tumorfälle einen routinemäßigen Einsatz in der Diagnostik erlauben soll. Die Frage, ob es beim Hund hinreichend charakteristische Expressionsprofile für bestimmte Karzinomarten gebe, ist allerdings auch nach Abschluß dieser Untersuchungen, nicht eindeutig zu beantworten: Mit den eingesetzten Antikörpern ließ sich zwar für bestimmte Tumoren ein bestimmtes Zytokeratin-Profil erstellen, doch waren diese Profile insofern nicht eindeutig, da distinkte Expressionen in mehreren Karzinomarten nachgewiesen werden konnten. Obwohl es also nicht gelang, jeder Karzinomart ein ganz bestimmtes Zytokeratinmuster zuzuordnen, ergeben sich durch den Einsatz von Zytokeratin-Antikörpern dennoch einige Vorteile:

- Der Nachweis von Gesamt-Zytokeratin (beispielsweise durch die Kombination der Antikörper AE1/AE3) ermöglicht es, undifferenzierte Neoplasien als epithelial zu erkennen.
- Breitspektrum-Antikörper wie AE1 sind hilfreich beim Nachweis von Karzinomen, die nur als Fragmente bei Feinnadelpunktionen, in Ausstrichen oder als Tumorzellemboli oder Mikrometastasen in Lymphknoten vorkommen. AE1 fehlt lediglich in Basaliomen, in Pilomatrixomen, in Tumoren der hepatoiden Drüsen und in einigen Trichoepitheliomen.
- Für die Differentialdiagnostik von Hauttumoren lassen sich mehr oder weniger eindeutige Zytokeratinmuster heranziehen:

Schweißdrüsen-Neoplasien (inkl. **Analdrüsen-Neoplasien**), exprimieren immer CK 8 und CK 18 (Antikörper CAM 5.2) und CK 19, wobei Mammatumore überraschenderweise diese Zytokeratine nur sehr inkonsistent exprimieren.

Talgdrüsentumore sind hauptsächlich LP34- und LL002-positiv, inkonsistent auch AE1-positiv. In **Tumoren der hepatoiden Drüsen** lassen sich neben LP34 und LL002 zusätzlich AE3 nachweisen.

Basalzellentumore zeigen folgende Reaktivitäten: AE1- und KL1-negativ, AE3-, LP34- und LL002-positiv.

Trichoepitheliome verhalten sich immunhistochemisch AE3-, LL002- und LP34-positiv sowie KL1-negativ (bzw. AE1-, AE3- und LP34 positiv, KL1-negativ) hingegen sind **keratotische oder baso-squamöse Basalzellentumore** immunhistochemisch AE1- und KL1-negativ, AE3-, LP34- und LL002-positiv.

Intrakutan verhornende Epitheliome reagieren AE3-negativ, AE1-, KL1-, LP34- und LL002-positiv.

Bei **Pilomatrixomen** reagieren keine der eingesetzten Antikörper.

Nicht ganz sicher lassen sich **Leber-Neoplasien** immunhistochemisch ansprechen, obwohl alle vom Gallengang ausgehende Neoplasien sich mit AE1 und weniger konsistent mit CAM 5.2. markieren lassen. Für Leberzell-Karzinome erscheint immer ein Einsatz von AFP empfehlenswert, obwohl nur etwa die Hälfte der Tumore immunreaktiv ist.

Perspektiven

Wünschenswert wäre es, eine Früherkennung von Karzinomen bereits serologisch durchführen zu können. Dies ist prinzipiell sicher möglich, da bereits in Frühstadien von Karzinomen serologisch Zytokeratinfragmenten nachzuweisen sind. In der Humanonkologie wird das beispielsweise mit dem Tissue Polypeptide Antigen (TPA), das aus Fragmenten zylinderepitheltypischer Zytokeratinen besteht (Moll 1987), bereits praktiziert. Bekannt ist weiterhin, daß der Level von Fragmenten von CK 19 im Serum mit dem Differenzierungsgrad von Neoplasien des Gastrointestinaltraktes, des Uterus, der Cervix und der Ovarien (Sakahara et al. 1994) sowie mit dem von Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Stieber et al. 1993) korreliert; allerdings werden Frühstadien noch nicht erkannt. Mit spezifischeren Antikörpern gegen Zytokeratinen wird es vielleicht auch möglich werden, serologisch das Vorkommen von bestimmten Karzinomen zu diagnostizieren.

Sind nun die Möglichkeiten der Zytokeratindiagnostik beim Hund ausgeschöpft? Sicherlich nicht: Zunächst bleibt die „Suche“ nach kreuzreagierenden Antikörpern weiterhin geboten, um ein genaueres Typing beim Hund zu ermöglichen. Bedauerlicherweise reagieren bereits erhältliche Antikörper gegen distinkte Zy-

okeratine des Menschen beim Hund nicht: Weder CK 17, noch einer der drei paraffingängigen Antikörper gegen CK 20 (von Prof. R. Moll freundlicherweise zur Verfügung gestellt) zeigten Kreuzreaktivitäten beim Hund.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß es – auch beim Hund – mehr Zytokeratine geben könnte als bislang bekannt ist: Unbekannte CK's mit ähnlichen Molekulargewichten, die mit ein- oder zweidimensionaler Elektrophorese nicht aufgetrennt werden, sind durchaus denkbar. Die Erfahrungen mit der Entdeckung von CK 20 (Moll, Schiller, and Franke 1990) oder von CK 2p (Collin et al. 1992) beim Menschen haben gezeigt, daß es durchaus noch CK's geben kann, die sich „versteckt“ halten.

Insgesamt gesehen wird die Routinehistologie – aufbauend auf der H.E.-Färbung – weiterhin zusammen mit exakten klinischen Vorberichten der erste (und wichtigste) Schritt im Befunden sein. Doch – und das haben die Untersuchungen dieser Schrift gezeigt – stehen mit zur Zeit erhältlichen Antikörpern gegen Intermediärfilamenten zusätzliche, sichere und schnelle Hilfsmittel für diagnostische Zweifelsfälle zur Verfügung. Auch aus finanziellen Gründen (ein mit APAAP gefärbter Schnitt kostet in der Herstellung ohne Personalkosten und je nach Antikörper etwa 7.- bis 15.- DM) wird ein Zytokeratintyping auf die erwähnten Zweifelsfälle und auf gesonderte wissenschaftliche Fragestellungen begrenzt bleiben müssen. Mit dem Entstehen und der Weiterentwicklung erfolgreicher Therapieprotokolle für die Tumorbehandlung beim Hund wird allerdings ein zweifelsfreies Diagnostizieren mit Hilfe der Intermediärfilamente in den nächsten Jahren eine deutlich wichtigere Rolle spielen. Um dies zu ermöglichen, möge diese Schrift einen Beitrag leisten.

Literatur

- Altmannsberger, M., M. Osborn, M. Droese, K. Weber, and A. Schauer. 1984. Diagnostic value of intermediate filament antibodies in clinical cytology. *Klinische Wochenschrift* 62:114 - 123.
- Bader, B.L., T.M. Magin, M. Hatzfeld, and W.W. Franke. 1986. Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19 an exceptional tail-less intermediate filament protein. *European Molecular Biology Organization Journal* 5:1865-1875.
- Franke, W.W., D.L. Schiller, R. Moll, S. Winter, E. Schmid, and I. Engelbrecht. 1981. Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *Journal of Molecular Biology* 153:933-959.
- Fuchs, E., A.L. Tyner, G.J. Giudice, D. Marchuk, A.R. Chaudhury, and Rosenberg. M. 1987. The human keratin genes and their differential expression. *Current Topics in Developmental Biology* 22:5 - 34.

- Fuchs, E. V., S.M. Coppock, H. Green, and D.W. Cleveland. 1981. Two distinct classes of epidermal keratin genes and their evolutionary significance. *Cell* 27:75 - 84.
- Kim, K.H., J.G. Rheinwald, and E.V. Fuchs. 1983. Tissue-specificity of epithelial keratins: differential expression of mRNAs from two multigene families. *Molecular and Cellular Biology* 3:494 - 502.
- Lobeck, H., J. Hollandt, D. Mischke, and G. Wild. 1988. Die Heterogenität der Zytokeratine epithelialer Zellen sowie ihre Beziehung zur Zelldifferenzierung (am Beispiel des Larynxepithels). *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 72:229-232.
- Lynch, M.H., W.M. O'Guin, C Hardy, L. Mak, and T.-T. Sun. 1984. Acidic and basic hair/nail hard keratins and their co-localization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to soft keratins. *Journal of Cell Biology* 103:2593-2606.
- Moll, R. 1987. Epithelial tumor markers: cytokeratins and tissue polypeptide antigen (TPA). In *Morphological tumor markers.*, edited by G. Seifert. Berlin: Springer Verlag.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia tumors and cultured cells. *Cell* 31:11 - 24.
- Moll, R., D.L. Schiller, and W.W. Franke. 1990. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *Journal of Cell Biology* 111:567 - 580.
- Rohwedder, A., O. Keminer, C. Hendricks, and J. Schaller. 1997. Detection of HPV DNA in trichilemmomas by polymerase chain reaction. *Jornal of Medical Virology* 51:119-125.
- Sakahara, H., T. Kousaka, H. Kobayashi, Z. Yao, M. Imamura, T. Mori, and J. Konishi. 1994. Serum cytokeratin 19 measured by CYFRA21-1 assay in patients with gastrointestinal and gynecologic malignancy. *International Journal of Oncology* 5:1137-1140.
- Stieber, P., U. Hasholzner, H. Bodenmuller, D. Nagel, L. Sunder-Plassmann, H. Diemann, W. Meier, and A. Fateh-Moghadam. 1993. CYFRA21-1, a new tumor marker in lung cancer. *Cancer* 72:707-713.
- Sugerman, P.B., and E.J. Shillitoe. 1997. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Disease* 3:130-147.
- zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288:F55-F78.

Arbeitsanleitungen für Immunhistochemie

Apparate, Ausrüstung, Chemikalien

Mikrotom	Färbeküvetten
Wasserbad	Färbegestelle
Trockenplatte	Mikroliter-Pipetten (0,1-10 µl; 10-100 µl;
Wärmeschrank	100-1000 µl)
Mikrowellenherd	Xylol
Autoklav	Azeton
Feuchte Kammer	Ethanol (100%)
Immunfärbecenter Sequenza™ (Fa. Shandon,	Aqua dest.
Frankfurt)	10N NaOH
Coverplates™ (Fa. Shandon, Frankfurt)	Konz. HCl
Waage	Deckgläschen
Magnetrührer	Kanadabalsam
Schüttler	Kaiser's Glycingelatine
Objektträger (OT)	

Formalin, neutral gepuffert

Formalin (37-40% w/v Formaldehyd)	100 ml
Dinatriumphosphat, wasserfrei6,5 g
Natriummonophosphat4,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Bouin'sche Lösung

Gesättigte Pinkrinsäure (1,2% w/v)75 ml
Formalin (40% w/v Formaldehyd)25 ml
Eisessig5 ml
gesättigte Pikrinsäure=1,17g/100 ml Aqua dest.	

B5 Stammlösung

Quecksilberchlorid12,0 g
Natriumacetat2,5 g
Aqua dest.200 ml

B5 gebrauchsfertige Lösung

B5 Stammlösung20 ml
Formalin (40% w/v Formaldehyd)2 ml

Poly-L-Lysin 0,1 %

Poly-L-Lysin10 mg
Aqua dest.10 ml
Auftropfen, ausstreichen und trocknen lassen	
Gebrauchslösung 4 Wochen haltbar	

Silane

3-Aminopropyltriethoxysilane12 ml
Azeton588 ml
OT in frische Lösung einstellen1 min
In Azeton waschen2x
Trocknen im Wärmeschrank bei 50 °Cüber Nacht

TBS: 0,05 M Tris Based Saline, pH 7,4 - 7,6

Trizma Base	.4,50 g
Trizma HCl	.34,25 g
NaCl	.43,90 g
Aqua dest.	.ad 5000 ml

PBS: 0,01 M Phosphate Buffered Saline, pH 7.40

NaCl 0,89%	.36 g
NaH ₂ PO ₄	.7,4 g
KH ₂ PO ₄	.2,15 g
Aqua dest	.ad 5000 ml

RPMI-Verdünnungspuffer 1 (für Primärantikörper und APAAP-Komplex)

RPMI 1640	.50 ml
inaktiviertes Fetales Kälberserum (FCS)	.5 ml
Na-Azid	.50 mg
pH mit konz. Trizma-HCl und Trizma-Base auf 7,4 bis 7,6 einstellen	

RPMI-Verdünnungspuffer 2 (für Brückenantikörper und "Mousification")

RPMI 10640	.50 ml
inaktiviertes gepooltes Hundeserum	.10 ml
Na-Azid	.50 mg
pH mit konz. Trizma-HCl und Trizma-Base auf 7,4 bis 7,6 einstellen	

0,1 % Pronase

Protease XXV (E)	.10 mg
TBS	.10 ml

0,05 % Saponin

Saponin	.5 mg
TBS	.10 ml

0,01 M Zitratpuffer, pH 6,0

Aqua dest.	.900 ml
2 N NaOH	.13 ml
Aqua dest.	.ad 1.000 ml

1M Levamisole

Levamisole	.2,408 mg
Aqua dest.	.100 µl

Levamisole-Stammlösung (ABC)

Levamisole	.24,1 mg
Aqua dest.	.1 ml

2% Bovines Serum Albumin (BSA)

BSA	.2g
PBS	.100 ml

3%ige H₂O₂-Methanollösung

30 % H ₂ O ₂	.20 ml
Methanol	.180 ml

Primärer Antikörper

Wird mit RPMI-Verdünnungspuffer 1 (APAAP) oder PBS (ABC) verdünnt.

Bei ABC ggf. in 2% BSA verdünnen.

Nach dem Ansetzen bei 1000 U/min. 2 min. lang zentrifugieren.

Brückenantikörper (APAAP) 1:100

Gegen Maus-Immunglobulin gerichteter Kaninchen-Antikörper; wird mit RPMI-Verdünnungspuffer 2 verdünnt. Nach dem Ansetzen bei 1000 U/min 2 min lang zentrifugieren.

“Mousification”-Antikörper (APAAP) 1:200

Falls der primäre Antikörper kein Maus-Immunglobulin ist, wird er mit einem Maus-Antikörper gerichtet gegen den Primäantikörper inkubiert. Wird mit RPMI-Verdünnungspuffer 2 verdünnt.

Nach dem Ansetzen bei 1000 U/min 2 min lang zentrifugieren.

Sekundärer Antikörper (ABC)

Biotinlierter Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Wird mit PBS verdünnt.

Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase-Komplex 1:100

Wird mit RPMI-Verdünnungspuffer 1 verdünnt. Nach dem Ansetzen bei 1000 U/min 2 min. lang zentrifugieren.

Substrat/Fast Red-Gemisch

NDT-Stammlösung

Naphtol-AS-MX-Phosphat200 mg

N,N-Dimethylformamid (DMF)20 ml

TBS, pH 8,2980 ml

Naphtol-AS-MX Phosphat in DMF lösen, dann mit TBS auffüllen.

Die Lösung ist im Kühlschrank mindestens 4 Wochen lagerbar.

NDT-Stammlösung100 ml

1M Levamisole100 µl

Fast-Red-TR Salz100 mg

Levamisole wird unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt, Fast-Red Salz gelöst und alles filtriert.

0,2 M 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (AMPD)

AMPD21,028 g

Aqu. bidest.ad 1000 ml

0,05 M TRIS-Entwicklungspuffer, pH 9,75

Trizma-Base4,9 g

Trizma-HCl1,5 g

NaCl8,8 g

Aqu. bidest.ad 1000 ml

pH mit konz. Trizma-Base und -HCl einstellen

5 %ige Neufuchsin-Stammlösung

Neufuchsin5 g

2N HClad 100 ml

4 %ige Natriumnitritlösung:

Natriumnitrit40 mg

Aqu. dest.ad 1 ml

Immer frisch ansetzen

Substrat/hexazotiertes Astraneufuchsingemisch

a) 5 %ige Neufuchsin-Lösung	.0,5 ml
4 %ige Natriumnitrit	.1,25 ml
beides für 1 min. unterm Abzug auf dem Schüttler reagieren lassen, dann in b) geben	
b) Tris-Entwicklungspuffer	.175 ml
Levamisole	.100 mg
0,2 M AMPD	.62,5 ml
in c) geben	
c) Naphtol-AS-BI-Phosphat	.125 mg
N,N-Dimethylformamid (DMF)	.1,5 ml
pH auf 8,7 einstellen und in Küvette filtrieren	

AEC-Stammlösung

AEC	.20 mg
DMF	.2,5 ml

0,1 M Na-Acetat

Na-Acetat	.6,81 g
Aqua dest.	.ad 500 ml

0,1 N Eisessig

Eisessig	.2,88 ml
Aqua dest.	.ad 500 ml

0,1 M Acetat-Puffer pH 5,1

0,1 M Na-Acetat	.79 ml
0,1 N Eisessig	.21 ml
AEC-Substratlösung	
AEC-Stammlösung	.2 ml
0,1 M Acetatpuffer	.28 ml
H ₂ O ₂ (30 %ig)	.50 µl
Erst AEC und Acetatpuffer mischen, dann H ₂ O ₂ zugeben. Falls ein Präzipitat auftritt, vor Gebrauch filtrieren	

DAB-Substrat-Lösung

PBS	.50 ml
DAB	.8 mg
H ₂ O ₂ (30 %ig)	.40 µl
oder	
TBS oder PBS	.20 ml
DAB	.10 mg
H ₂ O ₂ (30 %ig)	.100 µl
DAB zunächst in TBS oder PBS lösen, dann H ₂ O ₂ zugeben. Falls ein Präzipitat auftritt, vor Gebrauch filtrieren.	

ABC-PO-Substratlösung (Vectastain Kit)

Reagenz 1	.100 µl
TBS	.5 ml
Levamisole-Stammlösung	.20 µl
mischen, dann	
Reagenz 2	.100 µl
mischen, dann	
Reagenz 3	.200 µl
mischen	

Avidin-Biotin-Komplex

Reagenz A (Avidin DH)100 µl
 TBS10 ml
 mischen, dann:
 Reagenz B (biotinierte Meerrettich-Peroxidase)100 µl
 nochmals mischen

ABC-Alkalische Phosphatase-Komplex (ABC-AP)

Reagenz A (Avidin DH)100 µl
 TBS10 ml
 mischen, dann
 Reagenz B (biotinierte Alkalische Phosphatase H)100 µl
 nochmals mischen

10% Normalserum (ABC)

Deaktiviertes Serum5 ml
 PBS45 ml
 Serum aus der Spezies, aus der der sekundäre Antikörper stammt. Deaktivieren durch 56 °C Wasserbad für 30 min.

Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase-Methode (APAAP)

1. Etwa 3-5 µm dicke Schnitte schneiden, auf beschichtete OT aufziehen und im Brutschrank trocknen bei 40 °Cüber Nacht
 oder bei 60 °C für30 min.
2. Entparaffinieren:
 Xylol15 min.
 Azeton10 min.
 Azeton/TBS10 min.
 TBS10 min.
 Falls keine Vorbehandlung notwendig ist, weiter mit Schritt 4
3. Vorbehandlung:
 0,05 %iges **Saponin** für Kernantigene30 min.
 oder
 Pronase E bei 37 °C10 min.
 oder
Mikrowellenbehandlung (MWO=microwave oven):
 in 0,01 M Zitratpuffer bei 600 W2x 5 min
 bzw.
 bei Zytokeratinnachweisen in 6 M Harnstoff bei 600 W.2x5 min.
Die zu behandelnden Schnitte werden zur Mikrowellenbehandlung in eine Kunststoffküvette (Sigma) überführt. Die Küvette wird mit Puffer aufgefüllt und verschlossen. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ist die Küvette immer vollständig mit Objektträgern zu füllen.
 Nach den ersten 5 min. MWO-Behandlung wird verdampfter Puffer mit Aqua dest. aufgefüllt.

 Nach MWO-Behandlung die Schnitte abkühlen20-30 min.
 dann in TBS überführen.
 oder
Autoklavenbehandlung:
 Die zu behandelnden OT werden in Citratpuffer in einer verschlossenen und mit Aluminiumfolie umwickelten Kunststoffküvette (Sigma).
 Bei 120 °C erhitzt15 min.
 Abkühlen20-30 min.
 In TBS überführen

Die immunhistochemische Färbung erfolgt in dem "Immunfärbecenter Sequenza™" (Shandon, Frankfurt). Dazu werden die entparaffinierten Probenobjektträger auf zum Sequenza™ dazugehörigen Coverplates® montiert. Dabei entsteht ein kapillärer Spalt zwischen Objektträger und Coverplate® mit einem Volumen von 80 µl. In diesem Spalt hält sich das eingebrachte Reagenz und wird nach Zugabe von weiterer Flüssigkeit nach unten verdrängt. Die Coverplates® werden senkrecht in spezielle Inkubationskammern verbracht. Die Waschvorgänge werden mit jeweils 2 ml Waschpuffer pro Coverplate® durchgeführt.

Bei "manueller" Färbung in einer feuchten Kammer werden nach jedem Waschen die Objektträger um den Schnitt herum mit Fließpapier abgetrocknet und Waschpuffer von den Präparaten abgesaugt, wobei der Schnitt selbst feucht bleiben muß.

4. Inkubation mit Primäantikörper30 min.
5. Waschen in TBS5 min.
Sofern Primäantikörper aus der Maus, weiter mit Schritt 7
6. Bei Einsatz von Primäantikörpern, die nicht aus der Maus stammen, erfolgt eine "Mousification":
Falls Primäantikörper aus Kaninchen
Mouse-anti-Rabbit 1:20030 min.
Falls Primäantikörper aus Ratte
Mouse-anti-Rat 1:20030 min.
7. Brückenantikörper 1:10030 min.
8. Waschen in TBS5 min.
9. APAAP-Komplex 1:10030 min.
10. Waschen in TBS5 min.
11. Wiederholen der Schritte 7. bis 10.je 15 min.
12. Überführen der OT aus den Coverplates in eine Färbeküvette und Inkubation im Substrat-Chromogen-Gemisch auf dem Schüttler30 min.
13. Waschen in TBSmehrmals
14. Hämalaun konzentriert1 min.
15. Bläuen in Wasser1 min.
16. Eindecken in Kaisers Glyceringelatine und im Brutschrank bei 60 °C lagern bis die Feuchtigkeit verdampft ist

ABC-Methode

1. Etwa 3-5 µm dicke Schnitte schneiden, auf beschichtete OT aufziehen und im Brutschrank trocknen bei 40 °Cüber Nacht
oder bei 60 °C für30 min.
2. Entparaffinieren:
4x Xylolje 5 min.
4x 100% Ethanolje 3 min.
Aqua dest.3 min.
Falls keine Vorbehandlung notwendig, weiter mit Schritt 4
3. Vorbehandlung:
Saponin 0,05 % in TBS für Kernantigene30 min.
oder
Pronase E bei 37 °C10 min.
oder
Mikrowellenbehandlung (MWO=microwave oven):
in 0,01 M Zitratpuffer . bei 600 W2x 5 min
bzw.
bei Zytokeratinnachweisen in 6 M Harnstoff bei 600 W.2x5 min.

Die zu behandelnden Schnitte werden zur Mikrowellenbehandlung in eine Kunststoffküvette (Sigma) überführt. Die Küvette wird mit Puffer aufgefüllt und verschlossen. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ist die Küvette

immer vollständig mit Objektträgern zu füllen.

Nach den ersten 5 min. MWO-Behandlung wird verdampfter Puffer mit Aqua dest. aufgefüllt.

Nach MWO-Behandlung die Schnitte abkühlen20-30 min.

dann in TBS überführen.

oder

Autoklaven-Behandlung:

Die zu behandelnden OT werden in Citratpuffer in einer verschlossenen und mit Aluminiumfolie umwickelten Kunststoffküvette (Sigma)

Bei 120 °C erhitzt15 min.

Abkühlen20-30 min.

2x Aqua dest.je 2min.

3x 100% Ethanolje 3 min.

4. Unterdrückung endogener Peroxidasen mit

3% H₂O₂-Methanol30 min.

5. 3x Aqua dest.je 3 min.

6. OT auf Coverplates[®] montierten. Oder "manuelle" Färbung in einer feuchten Kammer.

7. Inkubation in 10% igem Normalserum45 min.

Oder: Bei hohen unspezifischen Färbeargebnisse bei 4 °Cüber Nacht

8. Primärantikörper, bei Raumtemperatur30 min

Oder: Bei hohen unspezifischen Färbeargebnisse bei 4 °C2-1 h

9. PBS5 min

10. 10% Normalserum15 min

11. PBS5 min

12. Sekundärer Antikörper (biotin. AK)30 min

13. PBS5 min

14. ABC-Komplex30 min

15. PBS5 min

DAB-Reaktion

16. DAB-Lösung10-25 min

oder bei hohen unspezifischen Färbeargebnissen: Schnitte in Küvette überführen und im Eisbad DAB-Reaktion unter Lichtabschluß5 min

17. Aqua dest.5 min

18. In Küvette: Gegenfärben mit konzentrierten Hämatoxylin45 sec

19. Wässern in Leitungswasser5 min

20. Aqua dest.3 min

21. 4x 100% Ethanolje 3 min.

22. 4x Xylolje 3 min.

23. Eindecken in Kanadabalsam

AEC-Reaktion:

ABC bis Schritt 15

16. Schnitte in feuchte Kammer überführen und bei ca. 50 °C weiterbehandeln

17. AEC-Lösung auftropfen7 min

18. AEC-Überschuß entfernen und frische AEC-Lösung auftropfen . .7 min

19. In Aqua dest. spülen, Überschuß entfernen und OT um den histologischen Schnitt herum mit Filterpapier trocknen

20. Eindecken in Glycerin-Gelatine und im Brutschrank bei 60 °C lagern, bis die Feuchtigkeit verdampft ist.

ABC-AP Methode

ABC-Methode bis Schritt 13, wobei Schritt 4. (Hemmung endogener Peroxidasen) entfällt

- | | | |
|--|-------|-----------|
| 14. ABC-AP-Komplex | | .45 min. |
| 15. TBS | | .5 min. |
| 16. AP-Substrat | | .30 min. |
| 17. Aqua dest. | | .5 min. |
| 18. Aus Coverplates in Küvette mit Leitungswasser überführen | | |
| 19. Konz. Hämatoxilin | | .1 min. |
| 20. Wässern in Leitungswasser | | .10 min. |
| 21. 4x 100% Ethanol | | je 3 min. |
| 22. 4x Xylol | | je 3 min. |
| 23. Eindecken in Kanadabalsam | | |

Peroxidase-Antiperoxidase Methode (PAP)

Schritte 1-11 wie ABC-Methode

- | | | |
|--|-------|---------|
| 12. Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper (1:100) | | .30 min |
| 13. PBS | | .5 min |
| 14. Meerrettichperoxidase-Kaninchen-Antiperoxidase-Komplex | | .30 min |
- weiter wie bei der ABC-Methode mit Schritt 15

Bemerkung: Als 10%iges Normalserum zum Blockieren unspezifischer Bindungen wird 10%iges Schweinenormalserum in PBS benutzt.

Indirekte Peroxidase-Methode (IP)

Für Kryo-Schnitte:	Für Paraffinschnitte:
---------------------------	-------	------------------------------

30 min. Lufttrocknen	4x Xylol für je 5 min
30 min Azeton-Fixierung	2x Aceton für 2 min.

danach

- | | | |
|---|-------|-------------|
| 1. 3x PBS für je | | .5 min |
| 2. Unterdrückung endogener Peroxidasen mit 3% H ₂ O ₂ -Methanol | | .30 min |
| 3. 2x PBS | | je 5 min. |
| 4. Normal goat 1:15 | | .10 min. |
| 5. Primär-AK (rabbit-anti-x) | | .40-60 min. |
| 6. 3x PBS | | .5 min |
| 7. Anti-Rabbit-Konjugat (Goat-anti-rabbit) 1:200 | | .30-40 min |
| 8. 3x PBS | | .5 min. |
- wie ABC-Methode ab Schritt 16

Arbeitsanleitung für SDS-PAGE und WESTERN BLOT

Apparate, Ausrüstung, Chemikalien

Homogenisator (Potter, Braun; Ultra-Turrax)	Saugflasche
Ultrazentrifuge	Mikroliter-Pipetten
Elektrophoresekammer	Waage
Stromversorger	Wägeschälchen
Blotkammer	Aqua dest. und bidest.
Magnetrührer	Handschuhe
Färbeschalen	

Lösungen für Gewebeaufbereitung

Puffer 1: PBS: pH 7,4

NaCl	.140 mM	8,18 g
KCl	.2,68 mM	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	.8,1 mM	1,44 g
KH ₂ PO ₄	.1,47 mM	0,26 g
Aqua bidest.		ad 1 l

Puffer 2: Homogenisierungspuffer, pH 6,8

NaCl	.96 mM	5,6 g
KH ₂ PO ₄	.8 mM	1,39 g
Na ₂ HPO ₂ •2H ₂ O	.5,6 mM	1 g ad
KCl	.1,5 mM	0,11 g
EDTA	.10 mM	3,722 g
DTT	.0,1 mM	0,02 g
Aqua bidest.		ad 1 l

Puffer 3: Extraktionspuffer pH 7,6

Tris-HCl	.10 mM	1,58 g	0,79 g
NaCl	.140 mM	8,18 g	4,09 g
EDTA	.5 mM	1,86 g	0,93 g
KCl	.1,5 M	111,84 g	55,92 g
Triton X-100	.0,5% (w/v)		
DTT	.5 mM	0,77 g	0,385 g
Aqua bidest.		ad 1 l	ad 500 ml

Lösungen und Reagenzien für SDS-PAGE

Probenpuffer, pH 6,8

Tris (Sigma, T 1503)	.1,51 g
Glycerol (Sigma, G 7757)	.20,0 ml
Aqua dest.	.35 ml
mit konz. HCl pH auf 6,8 einstellen	
SDS (Sigma, L5750)	.4,0 g
2-ME (Sigma, M 6250)	.10,0 ml
Bromphenolblau	.2 mg
Aqua dest.	ad 100 ml

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung

Acrylamid, reinst (Serva, # 10675)	.30 g
N,N'-Methylenbisacrylamid, reinst (Serva, # 29195)	.0,8 g
Aqua dest.	ad 100 ml
bei 4 °C im Dunkeln bis zu 2 Wochen haltbar	

Trenngelpuffer, pH 8,8

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan181,5g
 Aqua destad 500 ml
 pH 8,8 mit rauchender HCl einstellen

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan29,9 g
 Aqua destad 500 ml
 pH 6,8 mit rauchender HCl einstellen

20 % (w/v) SDS-Lösung

Natriumdodecylsulfat20,0 g
 Aqua destad 100 ml

10 % (v/v) TEMED-Lösung

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin0,1 ml
 Aqua destad 1 ml
 vor Gebrauch frisch herstellen

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung

Ammoniumpersulfat p.A.100 mg
 Aqua destad 1 ml
 vor Gebrauch frisch herstellen

Dithiothreitol 1 M (DTT)

Dithiothreitol, reinst (Serva)96 mg
 Aqua destad 0,5 ml

Elektrodenpuffer, pH 8,3

Tris6,05 g
 Glycin28,8 g
 20 % SDS-Lösung (= 2g)10 ml
 Aqua dest.ad 2.000 ml

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blau R 2500,48 g
 Methanol50,0 ml
 Eisessig100 ml
 Aqua dest.100 ml

Coomassie-Entfärbelösung

Methanol50 ml
 Eisessig75 ml
 Aqua dest.ad 1.000 ml

Destain I

Ethanol450 ml
 Eisessig100 ml
 Aqua bidest.450 ml

Destain II

Ethanol50 ml
 Eisessig75 ml
 Aqua bidest.875 ml

Reagenzien und Lösungen für den Tankblot

Elektrotransferpuffer, Stammlösung

Tris60,6 g
 Glycin281,6 g
 Aqua dest.ad 5.000 ml

Elektrotransferpuffer, Gebrauchslösung

Stammlösung200 ml
 Methanol200 ml
 Aqua dest.ad 1.000 ml

Proteinfixierlösung

Eisessig100 ml
 Isopropanol250 ml
 Aqua dest.ad 1.000 ml

Fixierungslösung

0,25 ml Glutaraldehydad 100 ml PBS
 Ponceau S-Färbelösung
 Eisessig100 µl
 Aqua dest.100 ml
 Ponceau S500 mg

Blockierungslösung, 3% BSA

Bovines Serumalbumin, Fraktion V3 mg
 PBS10 ml

Waschlösung

0,9 % NaCl und 0,1 % Tween 20in Aqua dest

Antikörperverdünnung

in PBS, pH 7,4, mit Zusatz von 1 % Tween 20

Konjugatpuffer-Lösung

Tris-HCl-Puffer 50 mM, pH 8,0 mit 1 % Tween 20
 Substratpuffer-Lösung
 Tris-HCl-Puffer 0,2 M, pH 8,0
 2 mM MgCl₂ 6H₂O

Substrat

Naphtol AS-MX Phosphat4 mg
 Aqua dest.10 ml
 Fast Red TR-Salz60 mg
 Substratpuffer10 ml
 unmittelbar vor Gebrauch in jeweils der Hälfte des benötigten Endvolumens ansetzen, mischen
 und filtrieren

Reagenzien und Lösungen für den Semidry-Blot

Anodenpuffer I

Tris36,3 g
 Methanol200 ml
 Aqua dest.ad 1000 ml

Anodenpuffer II

Tris3,03 g
Methanol200 ml
Aqua dest.ad 1000 ml
Kathodenpuffer		
6-Aminohexansäure (-Aminocaprinsäure)2,6 g
SDS0,05 g
Methanol100 ml
Aqua dest.ad 500 ml

Tris Based Saline (TBS)

Tris6,057 g
NaCl2,922 g
MgCl ₂0,508 g
Aqua bidest.ad 500 ml

Konjugat

Goat Anti-Mouse IgG (H+L) konjugiert mit AP (#M 30008; Medac, Hamburg)

Substratstammlösung 1

BCIP (5-Bromo-4 -Chloro-3-Indolyl-Phosphat)50 mg
Dimethylformamidad 1 ml

Substratstammlösung 2

NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium)2 mg
50% Dimethylformamidad 1 ml

Substratlösung

Substratstammlösung 1100 µl
Substratstammlösung 2500 µl
TBSad 100 ml

Stoppbad

EDTA (MW 368,4)3,684 g
PBSad 500 ml

Gel-Herstellung

Die Gele werden in einem Gießstand hergestellt. Dazu wird aus zwei mit Alkohol gereinigten speziellen Glasplatten (18x16 cm) mit seitlichen und unten eingelegten 1,5 mm dicken Abstandhaltern (Spacern) eine Gelkammer hergestellt. Auf ebener Fläche werden Glasplatten, Spacer und Klammern bündig ausgerichtet und die Klammern festgeschraubt. Mittels Exzentrerschrauben wird die Gelkammer im Gießstand fixiert. Mit heißer 1% (w/v) Agaroselösung werden die Ränder abgedichtet.

Für ein 12,5 % SDS-Trenngel werden folgende Lösungen in einer Saugflasche gemischt:

12,5 %-Trenngel, Ansatz für zwei 18x16 cm Gele bzw. zwei 13x7,4 cm Gele		
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung33,3 ml 20,85 ml
Trenngelpuffer, pH 8,840,0 ml 25,04 ml
Aqua dest.5,2 ml 3,26 ml

Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wird der Ansatz entgast, dann:

20 % SDS-Lösung0,40 ml 0,25 ml
10 % TEMED-Lösung0,40 ml 0,25 ml
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung0,56 ml 0,35 ml

Nach gründlicher Mischung wird die Gellösung unter Vermeidung von Luftblasen sofort in die Gelkammer eingefüllt und mit ca. 1 ml wassergesättigtem Butanol, ersatzweise Aqua bidest., überschichtet. Dies verhindert eine Störung der Polymerisation durch eindiffundierenden Sauer-

stoff und sorgt für eine glatte Oberfläche des Trenngels. Nach etwa 30-60 min. ist das Gel auspolymerisiert.

Für das Sammelgel werden folgende Lösungen in der Saugflasche gemischt:

3 %-Sammelgel

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	1,3 ml	1,05 ml
Sammelgelpuffer, pH 6,8	6,0 ml	4,84 ml
Aqua dest.	4,7 ml	3,79 ml

Die Lösung wird am Wasserstrahlvakuum entgast, dann:

20 % SDS-Lösung	0,1 ml	0,08 ml
10 % TEMED-Lösung	0,1 ml	0,08 ml
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung	0,1 ml	0,08 ml

Die Sammelgellösung wird gründlich gemischt. Das Butanol bzw. das Aqua dest. wird vom Trenngel abgossen und mit Filterpapier vollständig entfernt. Nach Einsatz der Probenkämme (Slotformer), wird das 3 % Sammelgel bis zum oberen Rand der Gelkammer auf das Trenngel dazugegeben. Nach dem Auspolymerisieren werden je zwei Gele in eine Trennkammer eingesetzt.

Gewebeaufbereitung für Zytokeratindarstellung:

- Nach Probenentnahme Gewebe in eiskaltem TRIS waschen, um Blut zu entfernen. Hautprobe 5 min. in 60 °C heißes Wasserbad einbringen. Anschließend die Epidermis abpellen, in flüssigem Stickstoff tieffrieren und bei -80 °C aufbewahren. Kubus von etwa 1 cm³ aus Organen gewinnen, in flüssigem Stickstoff tieffrieren und bei -80 °C aufbewahren. Das tiefgefrorene Gewebe wird mit einem Skalpell zerkleinert und je 500 mg mit 10 ml Puffer 2 in einem Homogenisator (Potter-Elvehjem, Braun) 3 min bei maximaler Geschwindigkeit (1.500 rpm) homogenisiert. Derbe Gewebe werden zuvor mit einem Ultra-Turrax Homogenisator (Typ TP 18/10) bei 20.000 U/min. zerkleinert.
- Das Homogenisat wird durch 4 Lagen Gaze bzw. durch einen Metallfilter mit einer Maschengröße von ~ 1 mm filtriert.
- Aus je dem Filtrat wird die Zytokeratinfraction mit der 10fachen Menge Puffer 3 für 30 min. bei 4 °C (Magnetrührer) extrahiert.
- Nochmals homogenisieren
- Zentrifugation bei 10.000 g für 20 min bei 4 °C. Überstand verwerfen.
- Das Pellet in ca. 5 ml Puffer 3 mit Hilfe des Homogenisators resuspendieren.
- Extrahieren der Zytokeratinfraction in 3fachem Volumen des Puffers 3 für 30 min. bei 4 °C (Magnetrührer)
- Zentrifugation bei 10.000 g für 20 min bei 4 °C in einer "Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifuge" mit dem Rotor SS 34 (Fa. DuPont). Überstand verwerfen.
- Die wasserunlösliche Fraktion wird mit Probenpuffer im Verhältnis 1:5 bei 95 °C 5 min gekocht, abgekühlt und jeweils 20 µl in die Gelslots eingefüllt.

SDS-PAGE

Oberer und unterer Pufferbehälter der Trennkammer werden jeweils mit 2 l Elektrodenpuffer gefüllt und die Slotformer entfernt.

- Die 20 Gelslots werden alternierend mit 10 µl des "Prestained SDS-PAGE Standards Low Range" (Serva) sowie jeweils mit 10 bzw. 18 µl der zu untersuchenden Proben gefüllt, der Deckel aufgesetzt und die Kühlschläuche angeschlossen.
- Die Elektrophorese wird bei Raumtemperatur durchgeführt: Zunächst ohne Probenbeschickung für 15 min. 500 V und 150 mA.. Nach der Probenbeschickung 500 V und 100 mA bis die Lauffront das Trenngel erreicht.

Dann für etwa 12 h mit 500V und 150 mA. (Stromquelle: "Bio-Rad's model 200/2.0, constant voltage power supply"). Der Elektrophoreselauf wird beendet, wenn die Bromphenolblau-Lösung den unteren Gelrand erreicht.

3. Nicht zum Blotten vorgesehene Gele werden direkt im Anschluß an die Elektrophorese für 1 h in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und danach mehrere Stunden in der Entfärbelösung bewegt, bis sich das Gel entfärbt hat und die Proteinbanden gut sichtbar werden.

Western Blot

Tankblotverfahren

1. Nach dem Elektrophoreselauf werden die Sammelgele mit einem Skalpell abgetrennt und entfernt. Die Trenngele für 30-60 min im Transferpuffer äquilibriert.
2. Die Transfermembranen werden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und mit Filterpapier in den Transferpuffer eingebracht.
3. Herstellung des „Gel-Transfer-Sandwich“: Das Gel wird auf der Kathodenseite (schwarz) des Gelhalters auf einen Scotch-brit-Schwamm und mit Transferpuffer getränktem Filterpapier gelegt. Die feuchte Nitrozellulose wird blasenfrei auf das Gel aufgebracht. Es folgen wiederum getränktes Filterpapier, Scotch-brit-Schwamm und die Anodenseite (rot) des Gelhalters. Das fertige Sandwich wird senkrecht in den mit 3 l Transferpuffer gefüllten Puffertank eingesetzt.
4. Transfer bei 100 mA über Nacht in einer Kühlzelle (4 °C).
5. NC-Membranen zwischen Filterpapier trocknen und bis zu Weiterverarbeitung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahren
6. Reversible Färbung der NC-Membranen mit Ponceau S zur Überprüfung des Protein-Transfers, ggf. dokumentieren. 5 min Färben, 5 min den Hintergrund in Aqua dest. bewegend entfärben. Vollständige Entfärbung der Banden durch Inkubation der NC-Folie in 0,2 M NaOH oder 0,2 M KOH. Durch die Alkalibehandlung wird die Antigen-Reaktivität verstärkt
7. NC-Membranen in Streifen schneiden
8. Blockierung freier Bindungsstellen in 3 % BSA-PBS für 1 h auf dem Schüttler.
9. Waschpuffer für 10 min. auf dem Schüttler
10. Inkubation mit den Antikörpern für 12 h bei 4 °C auf dem Schüttler
11. Waschpuffer für 10 min. auf dem Schüttler
12. Inkubation des anti-Spezies-spezifischen Konjugats (Ziege-anti-Mouse-IgG konjugiert mit AP, Dianova), 1:1000 für 1h bei RT
13. Waschpuffer 3x 10 min
14. Substratinkubation für 30 min bei RT im Dunkeln
15. Waschen und anschließend zwischen Filterpapier trocknen.

Semidryblot

1. Nach dem Elektrophoreselauf werden die Sammelgele mit einem Skalpell abgetrennt und entfernt
2. Anodenplatte der Transferkammer mit Aqua dest. befeuchten; überschüssiges Wasser mit saugfähigem Papier entfernen
3. Benötigte Filterpapiere (9 + 3 für Anode, 3 + 6 für Kathode) und NC-Folie auf Gelgröße zurechtschneiden
4. Anodenpuffer I in Schale geben, 9 Filterpapiere durchtränken und unter Vermeidung von Luftblasen auf Anodenplatte legen. Anodenpuffer I in Flasche zurückgießen
5. Drei Filterpapiere in Anodenpuffer II tränken und auf die vorhandenen 9 auflegen.
6. NC-Folie in absolutem Methanol tränken, 5 min. in Aqua bidest und 2-10 min in Anodenpuffer II tränken. Dann auf den Stapel auflegen
7. SDS-Gel in Kathodenpuffer für 5 min äquilibrieren

8. Gel auf die Blotfolie auflegen. Anodenpuffer II weggießen
9. Mit Parafilmstreifen Anodenpapierstapel vom aufzulegenden Kathodenpapierstapel isolieren.
10. Kathodenpuffer in Schale gießen, 3 und 6 Filterpapiere darin tränken und auf Gel auflegen. Mit Handroller Luftblasen entfernen
11. Kathodenplatte mit Aqua dest. abwischen und auf Stapel aufsetzen.
12. Sicherheitsdeckel auflegen und Kabel an Stromquelle anschließen
13. Blotten bei ca. 0,8 bis 1,0 mA/cm² für 1 h 30 min.
14. Stromquelle abschalten, Sicherheitsdeckel und Kathodenplatte abnehmen und Stapel auseinandernehmen.
15. Blockieren in PBS mit 0,5% Tween 20 für 60 min. Zweimal Wechseln
16. Inkubation mit Primärantikörper über 12 h auf dem Schüttler. Primärantikörper wird in PBS mit 0,5% Tween 20 und 1% BSA verdünnt.
17. 3x Waschen in PBS/0,5% Tween 20, je 5 min.
18. Konjugat-Inkubation. Konjugatverdünnung in PBS/0,5% Tween 20 für 2 h auf dem Schüttler
19. 3x Waschen in PBS/0,5% Tween 20, je 5 min.
20. Tris-Salzpuffer, 1 min.
21. Substratinkubation unter Lichtabschluß, 10-30 min. bei 37 °C; Sichtkontrolle
22. Stoppbad, 5 min.
23. Zwischen Filterpapier trocknen

EINGESETZTE ANTIKÖRPER

Antikörper	Spezies	Klon	Antigen	Quelle
AE1	M	AE1	40, 48 und 50 kD	ICN
AE3	M	AE3	58, 65, 67, 86 kD	ICN
AE8	M	AE8	CK 13	DCS (Biogenex),
Alpha-1 Fetoprotein	K		humanes Fetoprotein	Dako
Anti von Willebrand Factor	K		Von Willebrand Faktor	Dako
Anti-Bovine Papillomavirus	K		Genusspezifisches Strukturantigen	Dako
Anti-Cytokeratin AE1/AE3	M	AE1 und AE3	Saure & basische CK	Boehringer
Anti-Cytokeratin Peptide 18	M	CY-90	CK 18	Sigma
Anti-Cytokeratin Peptide 7	M	LDS-68	CK 7	Sigma
Anti-Cytokeratin Peptide 8	M	M20	CK 8	Sigma
Anti-Cytokeratin	M	CAM 5.2	CK 8, 18	Becton Dickinson
Anti-Cytokeratin No.13	M	Ks 13.1	CK 13 (14, 17)	Boehringer
Anti-Cytokeratin No.4	M	215 B8	CK 4	Boehringer
Anti-Cytokeratin No.7	M	Ks 7.18	CK 7	Boehringer
Anti-Cytokeratin Nr. 19	M	170.2.14	CK 19	Boehringer
Anti-Dog-IgG (H+L)	K			Dianova
Anti-goat IgG, biotiniliert	K			Camon
Anti-Human Cytokeratin	M	LP34	CK 6 CK 18	Dako
Anti-Human Neuron-Specific Enolase (NSE)	M	BBS/NC /VI-H14	humane gamma-Enolase	Dako
Anti-human Cytokeratin	M	MNF116	CK 5, 6, 8, 10, 17, 18, (19)	Dako
Anti-Keratin, wide spectrum screening	K		52, 56, 58 (60, 51, 48) kD	Dako
Anti-Neuron- Specific Enolase (NSE)	K		Säugetier NSE	Dianova
anti-human Cytokeratin 14	M	MCA890	CK 14	Serotec (Camon)
anti-human Pankr.Polypept.	K		PP	Dako
CD 3	K		CD3	Dako
Chromogranin A	K		Humanes Chromogranin A	Dako
Control IgG	M		Nichtimmunogenes Kontrollserum	Dianova
Cytokeratin 19	M	RCK108	CK 19	Dako
Cytokeratin 19	M	Ks 19.1	CK 19	Progen
Cytokeratin gp 56 kD	M	KL1	56 kD (CK 10/11)	Immunotech
Desmin	M	D33	Desmin	Dako
Fibrin neotope on beta-chain	M		Fibrin	Loxo
GFAP	K		GFAP, Rind	Dako
GFAP	M	6F-2	GFAP	Dako
Glucagon	K		Glucagon	Dako
Insulin	Ms		Schweine-Insulin	Dako
Keratin NCL-5D3	M	NCL-5D3	CK 8, 18, 19	Euro-Diagnostica
Keratin RCK 105	M	RCK 105	CK 7	Euro-Diagnostica
Mab Chromogranin	M	LK2H10	humanes Chromogranin A	Dako
Mab to Cytokeratin 1, 10/11	M	K8.60	CK 1, 10/11	Dako
Mab to Cytokeratin 17	M	Ks 17.E3	CK 17	Dako
Mab to Cytokeratin 17	M	Ks 17.E3	CK 17	Progen
Mab to Cytokeratin 17	M	Ks 17.E3	CK 17	Sigma
Mab to Cytokeratin 18	M	Ks 18.04	CK 18	Progen
Mab to Cytokeratin 19	M	Ks 19.1	CK 19	Progen
Mab to Cytokeratin 8	M		CK 8	DCS (Biogenex)
Mab to Actin	M	asm-1	-smooth-muscle isoform of actin	Progen
Maus Normal Serum				Dianova
Mouse Anti-Rabbit IgG (H+L)	M		Schwere Ketten, IgG des Kaninchens	Dianova
Mouse Anti-Rat IgG (H+L)	M		Schwere Ketten, IgG der Ratte	Dianova
Mouse IgG (Fab spec.)	M			Sigma
Neurofilament	M	2F11	NF 200kD und 70 kD	Dako
Normal Rabbit Serum	K		Nichtimmunogenes Kontrollserum	Dianova
Normal Dog Serum			Nichtimmunogenes Kontrollserum	Dianova
PanCytokeratin	M	lu-5	CK 1-19	DCS (Biogenex)
PLAP	K		Plazent. Alkal. Phosphatase	Dako
Protein A, biotinylated				Camon
Rabbit Ig Fraction	K		Nichtimmunogenes Kontrollserum	Dako
Rabbit Anti-Human IgA	K		alpha-Chains	Dako
Rabbit Anti-Human IgG	K		gamma-Chains	Dako
Rabbit Anti-Human IgM	K		Mu-Chains	Dako
Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)	K		Brückenantikörper	Dako
S-100	K		S-100 A und B	Dianova
Thyroglobulin	K		Humanes Thyroglobulin	Dako
Vimentin	M	V9	Vimentin (ger. aus Linse Schwein)	Dako
Vimentin	M	V3250	Vimentin (Fibroblasten Zellkultur)	Dianova
Vimentin	M	VIM 3B4	Vimentin (ger. aus Linse Rind)	Progen

M=monoklonal (Maus); K=polyklonal (Kaninchen); Ms=Polyklonal (Meerschwein)

Hersteller und Vertreiber von in dieser Schrift eingesetzten Antikörpern

Firma	Adresse	Telefon	Fax
Becton Dickinson	69126 Heidelberg	0 62 21 – 30 53 95	30 52 16
DCS (Biogenex)	22397 Hamburg	040 – 607 67 00	607 67 0 60
Boehringer MA	68298 Mannheim	06 21 – 75 90	7 59 85 09
Camon	65205 Wiesbaden	06 11 – 70 28 46	71 37 82
DAKO	22047 Hamburg	040 – 6 96 94 70	6 96 27 41
Dianova	20354 Hamburg	040 – 45 06 70	45 06 73 90
Euro-Diagnostica	NL-Apeldorn	00 31 – 55 – 42 24 33	425 017
ICN	53340 Meckenheim	0 56 51 – 92 10	92 11 51
Immunotech	20095 Hamburg	040 – 32 21 80	32 39 69
LD Labor Diagn.	46359 Heiden/Westf.	0 28 67 – 9 90 70	99 07 19
Loxo	69215 Dossenheim	062 21 – 86 02 24	86 01 79
Progen	69120 Heidelberg	0 62 21 – 8 27 80	82 78 23
Sigma	82039 Deisenhofen	01 30 – 51 55	0130 – 64 90

ABKÜRZUNGEN

95%-VB	95%-Vertrauensbereich	mk	Männlich, kastriert
ABC	Avidin-Biotin-Complex	ML	Malignes Lymphom
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol	MW	Mittelwert
AFP	-Fetoprotein	n, N	Anzahl
Ag	Antigen	n.b.	Nicht bestimmt
AK	Antikörper	n.u.	Nicht untersucht
AP	Alkalische Phosphatase	NC	Nitrocellulose
APAAP	Alkalische Phosphatase-antialkalische Phosphatase	NCA	Non-specific cross-reacting antigen
BPV	Bovines Papillomavirus	NF	Neurofilament
BSA	Bovines Serumalbumin	NSE	Neuronenspezifische Enolase
Ca	Karzinom	o.A.	Ohne Angabe
CD	Clusters of Differentiation	o.K.	Ohne Krebs
CEA	Karzi-embryonales Antigen	OR	Odds Ratio
CK	Zytokeratin	PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
D	Dalton	PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
DAB	Diaminobenzidin	PAP	Prostatic Acid Phosphatase
DSH	Deutscher Schäferhund	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
DTT	Dithiothreitol	pI	Isolelektrischer Punkt
EDTA	Ethylendiamintetrat	PLAP	Plazentare Alkalische Phosphatase
EMA	Epithelial Membrane Antigen	PO	Peroxidase
EPOS	Enhanced Polymer One-Step Staining	PSA	Prostata-spezifisches Antigen
FCS	Fetales Kälberserum	PSA	Prostatic specific antigen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	RPMI	Royal Park Memorial Institute
GFAP	Saures Gliafaserprotein	Sa	Sarkom
HRP	Meerrettich-Peroxidase	SDS	Sodiumdodecylsulfat
IF	Immunfluoreszenz	StAbw	Standardabweichung
Ig	Immunglobulin	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
J.	Jahr(e)	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
K.	Krebs	TPA	Tissue Polypeptide Antigen
k.A.	Keine Angabe	TRAP	Tatrat-resistente Alkalische Phosphatase
kD	Kilodalton	TRIS	2-Amino-2-(hydroxy-methyl)propan-1-3-diol
LAB	Labeled Avidin Biotin	vWF	von Willebrand Faktor
M	Molar	w	Weiblich
m	Männlich	wk	Weiblich, kastriert
mAK	Monoklonaler Antikörper	ZNS	Zentralnervensystem
MG	Molekulargewicht	ZW	Zwitter
min	Minute		

Zum Schluß

Was lange währt, wird gut ... sagt der Volksmund. Nun, angesichts der Tatsache, daß die Erstellung dieser Habilitationsschrift etwa 7 Jahre dauerte, sollte sie auch gut sein. Ist sie das? Dies zu beurteilen überlasse ich lieber anderen Sachkundigen.

Natürlich ist solch eine Schrift nicht nur das Ergebnis einsamer Genialität des Verfassers, sondern vielmehr die Summe der Arbeit einer Vielzahl mittel- und unmittelbar Beteiligter. Daher sei diesen Beteiligten an dieser Stelle herzlichst gedankt:

An erster Stelle möchte ich da meinen Lehrer und Förderer Univ.-Prof. Dr. Roland Rudolph nennen, der all die Jahre durch seinen freundlichen Optimismus, seine fachliche Kompetenz und durch seine unvergleichbare Menschenfreundlichkeit mich motivierte und ermutigte.

Auch Susanne Hahn, die mich nicht nur „histologisch“ betreute, trug wesentlich zum Gelingen bei.

Meinen „pathologischen Freunden“ Dr. Andreas Kirchhoff und Dr. Matthias Wölm sei für ihre aufbauende Freundschaft gedankt; das gilt auch für Dr. Monika Welle und Dr. Anja Sterner-Kock.

Weiterhin zu danken habe ich Frau Dr. Sonja Kling, Dr. Katrin Schwegler und Dr. Gabi Baatz für fachliche und freundschaftliche Unterstützung.

Den Kollegen Appel, Bartels, Fuchs, Haider und Weiler danke ich für vielfältige, klärende und befruchtende Diskussionen.

Natürlich danke ich auch den MTA`s, die in vielerlei Hinsicht die «backbone» des Instituts darstellten und darstellen: Frau Ansorge, Frau Buschenhagen, Frau Dauer, Frau Eckardt-Funke, Frau G. Hahn, Frau Harder, Frau Ilgmann, Frau Irmer und Frau Nehrig.

Ebenso zu erwähnen sind natürlich auch die Präparatoren des Instituts: Ines Krause, Dieter Nehrig, Werner Schultz und Bernd Waclawiak.

Frau Hanni Reichardt verdanke ich auch mehr als den Kaffee, den ich regelmäßig schnorrte.

Besonders erwähnen möchte ich auch Christiane Kastner-Walter und natürlich meine Mutter, Alwine Walter, die unter großen Opfern mir die Ausbildung ermöglichte und immer zu mir hielt.

Nicht vergessen möchte meinen Freund Ilhami, dessen abendlicher Tee und dessen nächtliche Gesprächsbereitschaft mir die letzten Jahre erleichterte.

Ganz zum Schluß habe ich auch Lucie dafür zu danken, daß sie geduldig oft auf ihren Vater verzichtete, weil er wieder einmal im Institut blieb oder am Computer hing; vielleicht bleibt Katharina dies erspart.

Curriculum vitae

Priv.-Doz. Dr.med.vet. Jakob Walter

geboren am 06. November 1953 in Landstuhl/Pfalz
verheiratet, 2 Töchter (11 Jahre, 1 Jahr)

Berufliche Erfahrungen

- Seit 1991 **Wissenschaftlicher Assistent** am Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin (Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph zugeordnet).
- 1989–1991 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** am Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin.
- 1987–1989 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, zuletzt **Abteilungsleiter Experimentalmedizin**, am Laser-Medizin-Zentrum GmbH, Berlin.

Studium & Promotion

- 1979–1984 **Veterinärmedizin** an der Freien Universität Berlin;
in dieser Zeit:
Beschäftigung als Studentische Hilfskraft am Institut für Vet.-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der FU Berlin (1981–1983) und Hospitant in den Berliner Kleintierpraxen Dr. V. Robl und Dr. K. Hertl (ab 1981–1987).
- 1985–1987 22. Januar 1985 Abschluß der Tierärztlichen Prüfung mit dem Gesamtergebnis „gut“.
28. Januar 1985: **Approbation als Tierarzt.**
Doktorant und NaFöG-Stipendiat am Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin.
Daneben:
Freier Mitarbeiter in der Kleintierpraxis Dr. V. Robl, Berlin;
mehrere Vertretungen in der Großtierpraxis Dr. G. Bollwin, Bad Wimpfen.
20. November 1987: **Promotion zum Doktor der Veterinärmedizin** mit „magna cum laude“ (Thema: Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Antigenlokalisation bei der Felinen Infektiösen Peritonitis unter Verwendung monoklonaler Antikörper).

Schul- und Berufsausbildung

- 1976–1979 Ausbildung zum Druckvorlagenhersteller Fachrichtung Reprofotografie bei der Klambt-Druck GmbH, Speyer.
Abschluß: Gehilfenprüfung und nachfolgende Beschäftigung bei Klambt-Druck GmbH, Speyer und im Druckhaus Tempelhof GmbH, Berlin.
- 1975– 1976 Studium der Germanistik, Publizistik und Soziologie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz (WS, SS).
- 1968–1975 Staatl. Aufbaugymnasium f. Jungen in Speyer/Rhein.
21. Mai 1975: **Allgemeine Hochschulreife.**

Qualifizierungen

06. Januar 1999: Zuerkennung der **Lehrbefähigung und -befugnis** durch den Fachbereich Veterinärmedizin der FU Berlin (Habilitation).
- 1997
Januar 1997: Bestallung als **Prüfer für die Fächer Allgemeine Pathologie und Spezielle Pathologische Anatomie und Histologie** durch die Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin.
- September 1997: **Diplomate of the European College of Veterinary Pathologists.**
- 1994
Anerkennung als **Fachtierarzt für Pathologie** durch die Tierärztekammer Berlin.
- 1988–1992
Ehrenamtlichen Richter der Kammer für Heilberufe bei dem Verwaltungsgericht Berlin.
- EDV-Beauftragter des Instituts; Röntgenschutzbeauftragter; Laserschutzbeauftragter.

Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Organisationen

- European College of Veterinary Pathologists.
- European Society of Veterinary Pathology.
- Charles Louis Davis Foundation for the Advancement of Veterinary and Comparative Pathology.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (Fachgruppe Pathologie).
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (Fachgruppe Epidemiologie).
- Gesellschaft der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin e.V.
- Deutsche Gesellschaft für Photographie, Sektion Medizin und Wissenschaft.

Berlin, Januar 1999