

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

**Histologische, immunhistologische und molekulargenetische
Untersuchungen zur BRAF-Variante V595E im kaninen
Übergangszell- und Prostatakarzinom**

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

vorgelegt von
Julia Maria Grassinger
Tierärztin aus Zwiesel

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4196

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

**Histologische, immunhistologische und molekulargenetische Untersuchungen zur
BRAF-Variante V595E im kaninen Übergangszell- und Prostatakarzinom**

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

vorgelegt von
Julia Maria Grassinger
Tierärztin aus Zwiesel
Berlin 2020
Journal-Nr.: 4196

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Zweite Gutachterin: PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach

Dritte Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Dogs, neoplasms, carcinoma, histology, immunohistology, molecular genetics, prostate

Tag der Promotion: 03.06.2020

Angefertigt bei Laboklin GmbH & Co. KG, Bad Kissingen

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen	III
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Das kanine Übergangszellkarzinom	2
2.1.1. Ätiologie, Rassedisposition, Alters- und Geschlechtsverteilung	2
2.1.2. Klinisches Bild	2
2.1.3. Diagnostik	3
2.1.4. Makroskopisches, zytologisches und histopathologisches Bild	5
2.1.5. Immunhistologisches Bild, Cyclooxygenase-2-Expression	6
2.1.6. Therapie	7
2.2. Das kanine Prostatakarzinom	9
2.2.1. Ätiologie, Rassedisposition, Altersverteilung	9
2.2.2. Klinisches Bild	9
2.2.3. Diagnostik	10
2.2.4. Makroskopisches, zytologisches und histopathologisches Bild	11
2.2.5. Therapie	13
2.3. Die BRAF-Variante V595E	15
3. Eigene Untersuchungen	18
3.1. Ziele und Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen	18
3.2. Zusammenstellung der eigenen Publikationen	20
3.2.1. Studie 1: Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Biopaten beim kaninen Übergangszellkarzinom. AUPPERLE-LELLBACH H, GRASSINGER J, HOHLOCH C, KEHL A, PANTKE P. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2018 Oct; 46(5):289-295. doi: 10.15654/TPK-1805542018.	21
3.2.2. Studie 2: Correlation of BRAF Variant V595E, Breed, Histological Grade and Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Transitional Cell Carcinomas. GRASSINGER JM, MERZ S, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, KLOPFLEISCH R. Vet Sci. 2019 Mar; 19;6(1). pii: E31. doi: 0.3390/vetsci6010031..	31
3.2.3. Studie 3: Nachweis der BRAF-Mutation bei kaninen Prostataerkrankungen. GRASSINGER JM, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, MERZ S, KLOPFLEISCH R. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2019 Oct; 47(5):313- 320. doi: 10.1055/a-0987-8212.	46
4. Diskussion	58
4.1. Untersuchungsgut, Auswertungsschemata, Limitationen	58
4.2. Diagnostische Relevanz der BRAF-Mutation im kaninen Übergangszell- und Prostatakarzinom	61
4.3. Therapeutische Relevanz der BRAF-Mutation im kaninen Übergangszell- und Prostatakarzinom	64

5.	Zusammenfassung	67
6.	Summary	69
7.	Literaturverzeichnis.....	71
8.	Publikationsverzeichnis.....	84
9.	Danksagung.....	86
10.	Erklärung zu Interessenskonflikten	87
11.	Selbstständigkeitserklärung	88

Liste der verwendeten Abkürzungen

BRAF	B Isoform des Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
COX	Cyclooxygenase
ddPCR	droplet digital PCR
et al.	und andere
PCa	Prostatakarzinom(e)
sog.	sogenannte
ÜZCa	Übergangszellkarzinom(e)
v. a.	vor allem
V-BTA	Bladder Tumor-Associated Antigen
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Eine Gensequenzierung zum Nachweis von Keimbahn- oder somatischen Mutationen wird in der Humanmedizin mittlerweile als Routineverfahren in der weiterführenden Tumordiagnostik eingesetzt. In der Tiermedizin steht dieses Verfahren erst seit Kurzem für die Diagnostik und nähere Charakterisierung einzelner Neoplasien zur Verfügung.

Eine in der Humanmedizin bekannte onkogene Mutation ist die BRAF-Variante V600E. Eine identische Mutation konnte in amerikanischen Studien (MOCHIZUKI et al. 2015a; MOCHIZUKI und BREEN 2015) auch in Tumoren des Hundes nachgewiesen werden. Dabei ist diese Mutation beim Hund am häufigsten in Übergangszellkarzinomen (ÜZCa) sowie in Prostatakarzinomen (PCa) zu finden (MOCHIZUKI et al. 2015a).

Bei kolorektalen Karzinomen des Menschen ist eine Korrelation zwischen der BRAF-Mutation und dem histologischen Grad sowie zwischen der Mutation und der Cyclooxygenase (COX)-2-Expression bekannt (CHEN et al. 2014; JANG et al. 2017; JIN et al. 2018). Des Weiteren ist in humanen Harnblasenkarzinomen ein Zusammenhang zwischen der Invasivität des Tumors und der COX-2-Expression beschrieben (SHARIAT et al. 2003; TABRIZ et al. 2013).

Die Detektion der BRAF-Mutation in zytologischen Ausstrichen von Harnsedimenten bzw. von Feinnadelaspiraten des Hundes war bislang jedoch nicht etabliert. Außerdem wurde bis dato weder die Sensitivität noch die Spezifität des Nachweises der BRAF-Mutation für das kanine ÜZCa und das kanine PCa noch ihre Häufigkeit bei den untersuchten Hunderassen eines europäischen Tiergutes beschrieben. Die Korrelation zwischen der BRAF-Mutation, dem histologischen Grading sowie der COX-2-Expression der Tumorzellen im kaninen ÜZCa war ebenfalls noch in keiner Studie untersucht worden.

Ziele der Studien waren daher: 1) erstmals den diagnostischen Nutzen des Nachweises der BRAF-Mutation für das kanine ÜZCa und PCa in der europäischen Hundepopulation zu untersuchen; 2) dieses innovative molekulargenetische Verfahren u. a. im Sinne einer sog. **Liquid Biopsy** aus Urin als kommerziellen Test zu etablieren; 3) die prognostische und therapeutische Aussagekraft des Nachweises der BRAF-Mutation in kaninen ÜZCa und PCa zu untersuchen, um molekulargenetische Grundlagen für eine gezielte, personalisierte onkologische Therapie dieser Neoplasien des Hundes zu entwickeln.

2. Literaturübersicht

2.1. Das kanine Übergangszellkarzinom

2.1.1. Ätiologie, Rassedisposition, Alters- und Geschlechtsverteilung

Das Übergangszellkarzinom (ÜZCa) ist die häufigste Neoplasie im Harntrakt des Hundes, wobei insgesamt nur 1,5 – 2 % aller kaninen Tumoren ÜZCa sind (PRIESTER und MCKAY 1986; KNAPP und MCMILLAN 2013). Das Ursprungsgewebe dieser Neoplasie ist das Übergangsepithel, welches die harnableitenden Wege auskleidet und somit vom Nierenbecken über die Harnleiter in die Harnblase bis in die Harnröhre hinein zu finden ist (MEUTEN und MEUTEN 2017). Nur ca. 5 % aller epithelialen Tumoren der Nieren sind ÜZCa, aber 100 % der Harnleitertumoren, 74 % der Harnblasentumoren und ca. 50 % aller Harnröhrentumoren (MOHAMMED et al. 2004; MEUTEN und MEUTEN 2017). In der Harnblase entwickeln sich ÜZCa am häufigsten im Bereich des Trigonum vesicae, also zwischen den Harnleitermündungen und der Harnröhrenöffnung (KNAPP et al. 2000a; GRAUER 2010).

Die Ätiologie des kaninen ÜZCa ist höchstwahrscheinlich multifaktoriell (KNAPP et al. 2000a; MUTSAERS et al. 2003). Als Risikofaktoren sind topisch aufgetragene Insektizide zur Floh- und Zeckenprävention (GLICKMAN et al. 1989), Obesitas (GLICKMAN et al. 1989) sowie eine Behandlung mit Cyclophosphamiden (WELLER et al. 1979; MACY 1983) beschrieben. Eine Rassedisposition ist für Scottish Terrier, Eskimohunde, Shetland Sheepdogs, West Highland White Terrier, Keeshonds, Samojeden und Beagle beschrieben (FULKERSON und KNAPP 2015).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind betroffene Hunde meist 11 Jahre alt (Median) (KNAPP et al. 2000a). Ein erhöhtes Risiko haben weibliche Tiere und kastrierte Hunde beider Geschlechter (KNAPP et al. 2000a). Spekuliert wird, ob bei diesen Tieren ein Zusammenhang mit einer verringerten Miktionsfrequenz und einer daraus resultierenden erhöhten Expositionszeit des Epithels mit tumorauslösenden Reagenzien besteht (HAYES 1976).

2.1.2. Klinisches Bild

An einem ÜZCa erkrankte Hunde zeigen als häufigstes klinisches Symptom Harnabsatzprobleme. Dabei können sowohl Hämaturie, Pollakisurie als auch Dysurie bzw. Strangurie auftreten (NORRIS et al. 1992; BORJESSON et al. 1999; KNAPP et al. 2000a; GRAUER 2010). Seltener werden Lahmheiten, Lethargie und Gewichtsverlust beobachtet

(KNAPP et al. 2000a; MUTSAERS et al. 2003). Das klinische Bild des kaninen ÜZCa ähnelt dem eines einfachen entzündlichen Geschehens und geht auch häufig gleichzeitig mit diesem einher (BUDRECKIS et al. 2015). Eine vorläufige Besserung in Folge einer antibiotischen Therapie führt deshalb, zumindest zu Beginn der Behandlung, oft zu einer Verwechslung beider Krankheitsbilder (CANNON und ALLSTADT 2015; FULKERSON und KNAPP 2015; PANTKE 2018). Diese anfängliche Missdeutung der klinischen Symptomatik resultiert mitunter in einer späten Diagnosestellung, zu einem Zeitpunkt, an dem eine Metastasierung bereits häufig stattgefunden hat (KNAPP und MCMILLAN 2013). Dementsprechend ist die Prognose für Hunde mit ÜZCa schlecht (KNAPP und MCMILLAN 2013; CANNON und ALLSTADT 2015; FULKERSON und KNAPP 2015). Laut HENRY (2003) ist, unabhängig von der Art der Behandlung, nie eine mediane Überlebenszeit von länger als einem Jahr beschrieben. Durch die häufige Lokalisation im Trigonum vesicae kann es in manchen Fällen auch zu einem uni- oder bilateralen Hydroureter oder einer Hydronephrose kommen (GRAUER 2010).

2.1.3. Diagnostik

Wie bereits kurz erwähnt, wird das kanine ÜZCa meist sehr spät, oft erst nach einer langwierigen, erfolglosen Antibiotikatherapie diagnostiziert (PANTKE 2018). Im Rahmen der klinischen Untersuchung kann in manchen Fällen rektal oder transabdominal eine abnormale Masse oder eine diffuse Verdickung der Blasenwand und Schwellung der Sakral-/Sublumballymphknoten palpirt werden (HELLER 2006; GRAUER 2010). Bei der Untersuchung des Harnsediments zeigen sich in bis zu 90 % der erkrankten Hunde Abnormalitäten (Hämaturie (> 75 %), Pyurie (50 %), Proteinurie (30 %) oder eine Bakteriurie (30 %)) (MEUTEN und MEUTEN 2017). All diese Befunde sind jedoch sehr unspezifisch und bedürfen der weiteren Abklärung.

Das wohl am häufigsten verwendete bildgebende Verfahren in der Diagnostik eines ÜZCa ist die Ultraschalluntersuchung der Harnblase (HELLER 2006). Hinweise auf eine Neoplasie liefern hier fokale anhaftende, unregelmäßige, in das Lumen hineinragende Gewebemassen unterschiedlicher Echogenität und Größe, aber auch Wandverdickungen und knötchenförmige Zubildungen, welche einer polypoiden Zystitis ähneln können (PANTKE 2018). Alternativ zur Ultraschalluntersuchung kann eine Endoskopie durchgeführt werden und so eine akkurate, bildliche Beurteilung des unteren Harntraktes erfolgen (PANTKE 2018). Auch mittels Zystographie in Kombination mit Kontrastmitteleinsatz konnten in 96 % der von NORRIS et al. (1992) untersuchten Neoplasien des unteren Harntraktes neoplastische Massen nachgewiesen werden.

2. Literaturübersicht

Eine zytologische Untersuchung kann in manchen Fällen ebenfalls zu einer Diagnose führen (WYCISLO und PIECH 2019). Sie ist jedoch nicht immer eindeutig und wird von vielen Faktoren, wie dem Erfolg der Probenentnahme oder dem gleichzeitigen Vorliegen einer Entzündung beeinflusst (WYCISLO und PIECH 2019). Die zytologische Untersuchung von Urin, in den ÜZCa häufig neoplastische Zellen abschilfern, kann zudem sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Diagnosen führen und sollte daher mit Vorsicht interpretiert werden (BORJESSON et al. 1999; FULKERSON und KNAPP 2015).

Den Goldstandard für die Diagnostik des kaninen ÜZCa stellt deshalb die histopathologische Untersuchung dar (HELLER 2006; CHILDRESS et al. 2011; BRACHA et al. 2014). Sie ermöglicht die Charakterisierung der Histogenese, die Bestimmung der Dignität sowie die sichere differenzialdiagnostische Abklärung eines entzündlichen Geschehens (PANTKE 2018).

Für die beiden genannten pathologischen Untersuchungsmöglichkeiten sind eine unter Ultraschallkontrolle entnommene Ansaugbiopsie, eine Feinnadelaspiration oder eine endoskopische Biopsie die besten Wege der Probenentnahme (CHILDRESS et al. 2011; PANTKE 2018). Das in der Literatur bei der Feinnadelaspiration oft diskutierte Transplantationsrisiko von Tumorzellen entlang des Stichkanals kann nach NYLAND et al. (2002) als gering eingeschätzt werden. Jedoch sind alle genannten Verfahren der Probeentnahme invasiv, kostspielig und/oder erfordern eine Anästhesie (PALLAORO et al. 2018). In manchen Fällen sind sie auch durch Größe, Alter, Geschlecht, Temperament oder durch Vorerkrankungen der einzelnen Hunde sowie durch die technische Ausstattung der tierärztlichen Praxis begrenzt (CHILDRESS et al. 2011).

Labordiagnostische Verfahren zur Diagnose eines ÜZCa ohne invasive Probenentnahme gibt es nur wenige. Eine dieser Methoden ist der Nachweis des Bladder Tumor-Associated Antigens (V-BTA) im Urin über einen Teststreifen (BORJESSON et al. 1999; BILLET et al. 2002; HENRY 2003). Sobald allerdings geringe Blutbeimengungen, eine Glucosurie, Proteinurie oder Pyurie vorliegen, besitzt dieser Test eine eingeschränkte Aussagekraft und kann falsch positiv sein (BORJESSON et al. 1999; BILLET et al. 2002). All diese Urinveränderungen, die den Test auf V-BTA beeinflussen, sind häufige Befunde bei Hunden mit ÜZCa (BORJESSON et al. 1999; MEUTEN und MEUTEN 2017). Somit ist der Einsatz des V-BTA-Tests in der Diagnostik des kaninen ÜZCa als kritisch anzusehen. Die Messung der Konzentration von Calgranulin A, B und C im Urin ist als möglicher Screeningtest in der Diagnostik des kaninen ÜZCa beschrieben (Spezifität 66 %, Sensitivität 96 %) (HEILMANN et al. 2017). Als diagnostischer Marker für das kanine ÜZCa ergab die Mikrosatelliteninstabilität im Urin keine ausreichende Spezifität (68 %) und Sensitivität (55 %) (SOTIRAKOPOULOS et

al. 2010). Mittels MicroRNA-Analysen konnten auch die Gene miR-103b, miR-16, miR-34a und miR-106b als mögliche diagnostische Parameter identifiziert werden (VINALL et al. 2012; KENT et al. 2017). PALLAORO et al. (2018) entwickelten, basierend auf oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie, eine quantitative Urinzytologie, in der das Peptid PLZ4 im Urin von Hunden mit ÜZCa signifikant erhöht war. Bislang gibt es aber weder für die Bestimmung von Calgranulinen noch für die Messung der Mikrosatelliteninstabilität, die MicroRNA-Analysen oder für die quantitative Urinzytologie mittels oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie entsprechende kommerziell erhältliche Tests.

2.1.4. Makroskopisches, zytologisches und histopathologisches Bild

Makroskopisch werden papilläre von nicht-papillären, flachen ÜZCa unterschieden. Letztere ragen nicht in das Harnblasenlumen hinein und lassen die Blasenwand nur geringgradig verändert erscheinen (MEUTEN und MEUTEN 2017). Im Bereich des Tumors ist die Harnblasenwand meist verdickt und sklerotisch (MEUTEN und MEUTEN 2017). ÜZCa treten meist solitär in der Harnblase auf, können aber auch multipel vorkommen oder die ganze Mukosa bedecken (MEUTEN und MEUTEN 2017).

Zytologisch sind viele ÜZCa stark pleomorph und weisen eindeutige Malignitätskriterien (starke Anisozytose und Anisokaryose) auf (BORJESSON und DEJONG 2016; WYCISLO und PIECH 2019). Die Zellen können einzeln oder in Clustern auftreten und enthalten häufig helle, magentafarbene, zytoplasmatische Vakuolen, die sog. Melamed-Wolinska bodies (MEUTEN und MEUTEN 2017; WYCISLO und PIECH 2019). Insbesondere gut differenzierte ÜZCa, die nur minimalen Pleomorphismus zeigen, sind zytologisch schwer diagnostizierbar (WYCISLO und PIECH 2019). Zudem können v. a. bei entzündlichen Veränderungen hyper- oder dysplastische Zellen zytologisch mit neoplastischen Zellen verwechselt werden (NORRIS et al. 1992; PANTKE 2018; WYCISLO und PIECH 2019).

Histologisch gibt es verschiedene Einteilungsschemata, denen jedoch allen die Invasivität in die Blasenwand sowie die Zellmorphologie zugrunde liegen (PATRICK et al. 2006). Nach MEUTEN und MEUTEN (2017) werden low- von high-grade ÜZCa differenziert. Low-grade ÜZCa sind durch geringgradige Invasion der Submukosa und eine intakte Basalmembran charakterisiert. Sie zeigen gering- bis mittelgradige zelluläre Atypien, geringgradige Zellanomalien, wenige bis keine Mitosen und keine Invasion in Blut- oder Lymphgefäße (MEUTEN und MEUTEN 2017).

High-grade ÜZCa hingegen weisen einen Verlust der Zellpolarität, unorganisiertes Wachstum, hochgradige zelluläre Atypien und Zellkernpleomorphismen sowie zahlreiche Mitosen auf. Die

Basalmembran ist zerstört und der Tumor ist in tieferen Wandschichten sowie in Blut- und Lymphgefäßen zu finden (MEUTEN und MEUTEN 2017). PATRICK et al. (2006) differenziert high-grade Neoplasien basierend auf der ersichtlichen Zellmorphologie und Zellarchitektur weiter in high-grade, Grad II und Grad III. In der Literatur sind am häufigsten high-grade Tumoren mit muskelinvasivem Wachstum beschrieben (VALLI et al. 1995; MUTSAERS et al. 2003). Es ist jedoch unklar, ob dies durch den oft späten Zeitpunkt der Diagnose oder durch das primär aggressive Wachstum dieser Neoplasie bedingt ist. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind Lymphknotenmetastasen bereits bei 16 %, Fernmetastasen bei 14 % und sowohl Lymphknoten- als auch Fernmetastasen bei 10 % der Hunde zu finden (KNAPP et al. 2000a).

2.1.5. Immunhistologisches Bild, Cyclooxygenase-2-Expression

Immunhistologisch ist im kaninen ÜZCa eine Expression der Cyclooxygenase-2 beschrieben (KHAN et al. 2000; KNOTTENBELT et al. 2006; LEE et al. 2007). Cyclooxygenasen (COX) sind die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme in der Prostaglandinbiosynthese. Sie sind in die Apoptoseinhibition, Zellproliferationsförderung, Angiogenesestimulation sowie in die Immunitätsminderung involviert (CARVALHO et al. 2017). Es werden zwei Isoenzyme unterschieden: COX-1 und COX-2. Das Isoenzym COX-1 wird im normalen Gewebe exprimiert, während COX-2 v. a. in vielen Neoplasien (Plattenepithel-, Mamma- und Prostatakarzinome) und Entzündungszellen zu finden ist (MOHAMMED et al. 2004). Auch in der Harnblase des Hundes wird COX-1 im normalen Übergangszellepithel und COX-2 in ÜZCa exprimiert (KHAN et al. 2000). Je nach Studie exprimieren 57,7 – 100 % der kaninen ÜZCa COX-2 (KHAN et al. 2000; LEE et al. 2007). In der Bewertung der COX-2-Expression muss sowohl der Anteil der exprimierenden neoplastischen Zellen als auch die Intensität der Expression berücksichtigt werden. V. a. müssen in der Beurteilung die COX-2-positiven Entzündungszellen außer Acht gelassen werden, um eine Überbewertung der COX-2-Expression zu vermeiden. Die Auswertungsschemata innerhalb der Studien, welche die COX-2-Expression in kaninen ÜZCa thematisieren, variieren jedoch enorm, weshalb die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Studien schwierig ist. In der Humanmedizin gilt eine gesteigerte COX-2-Expression von ÜZCa als Marker für hohe Invasivität, eine gesteigerte Rezidivrate und eine geringe Überlebensrate (KÖMHOF et al. 2000; AGRAWAL et al. 2018). Für das kanine ÜZCa gibt es jedoch keine Studien, die dies untersucht haben.

2.1.6. Therapie

Hinsichtlich der Behandlung des kaninen ÜZCa sind u. a. chirurgische Eingriffe, die Radiotherapie sowie die Gabe von Chemotherapeutika und/oder COX-Inhibitoren als Mono- und Kombinationstherapie beschrieben (MARVEL et al. 2017; PANTKE 2018).

Chirurgische Eingriffe werden in der Behandlung des kaninen ÜZCa als palliative Maßnahme angesehen (HENRY 2003). Denn es ist, aufgrund der typischen Lokalisation im Trigonum vesicae, der häufigen Hamnröhrenbeteiligung sowie multiplen Tumorherden und in manchen Fällen auch aufgrund von Metastasen, meist nicht möglich, ÜZCa chirurgisch ganz aus der Blase zu entfernen (MUTSAERS et al. 2003; CANNON und ALLSTADT 2015; FULKERSON und KNAPP 2015; MARVEL et al. 2017). Nichtsdestotrotz ist die chirurgische Behandlung hinsichtlich der palliativen Wiederherstellung und Beibehaltung des Urinabflusses sehr wichtig (FULKERSON und KNAPP 2015). Dabei spielt die transurethrale Resektion von störenden, die harnableitenden Wege verlegenden Tumormassen die größte Rolle (FULKERSON und KNAPP 2015). Ebenfalls gute Möglichkeiten zur palliativen Obstruktionsbehandlung sind die ultrasonographisch kontrollierte endoskopische Diodenlaserablation (CERF und LINDQUIST 2012) sowie das Einsetzen von Stents (WEISSE et al. 2006; MCMILLAN et al. 2012).

Hinsichtlich der Radiotherapie als Behandlungsmöglichkeit des kaninen ÜZCa liegen derzeit nur wenige Studien vor (PANTKE 2018). Die beschriebenen Nebenwirkungen sind jedoch zahlreich (Pollakisurie, Inkontinenz, Zystitis, Strangurie und Hydronephrosen) (WALKER und BREIDER 1987). Weitere Studien bezüglich der Radiotherapie sind nötig, um deren Nutzen besser einschätzen zu können und optimale Bestrahlungsprotokolle zu entwickeln (GRIFFIN et al. 2018).

Aufgrund des Mangels an guten lokalen Therapiemöglichkeiten von Tumoren des Harntraktes ist eine systemische Behandlung häufig die Behandlung der Wahl (CANNON und ALLSTADT 2015). Laut MARVEL et al. (2017) ist die systemische medikamentöse Therapie mit Chemotherapeutika und COX-Inhibitoren, jeweils alleine, aber auch in Kombination, die Grundlage der Therapie des kaninen ÜZCa. Viele verschiedene Chemotherapeutika u. a. Cisplatin (MOORE et al. 1990), Mitoxantron (POIRIER et al. 2004), Vinblastin (ARNOLD et al. 2011) und Gemcitabin (MARCONATO et al. 2011) zeigen eine Aktivität gegen das kanine ÜZCa und verschiedene chemotherapeutische Behandlungsprotokolle sind beschrieben (FULKERSON und KNAPP 2015). Auch der COX-Inhibitor Piroxicam zeigt sowohl in der Monotherapie (KNAPP et al. 1994) als auch in Kombination mit Chemotherapeutika gute Erfolge in der Behandlung kaniner ÜZCa (HENRY 2003). Dabei reduziert Piroxicam als Monotherapeutikum das Tumolvolumen (MOHAMMED et al. 2002), induziert in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin häufiger eine Remission als Cisplatin alleine (KNAPP

2. Literaturübersicht

et al. 2000b) und steigert die Wirkung von Vinblastin signifikant (KNAPP et al. 2016). Allerdings ist der Effekt und v. a. der Wirkmechanismus der COX-Inhibitoren noch nicht vollständig geklärt (KNOTTENBELT et al. 2006).

Eine Alternative zur klassischen Chemotherapie stellt die metronomische Chemotherapie dar (SCHREMPP et al. 2013; PANTKE 2018). Dabei handelt es sich um die Verabreichung von häufigen kleinen Dosen eines Chemotherapeutikums (z. B. Chlorambucil) mit dem Ziel, die Tumorprogression zu verzögern oder ganz zu verhindern (SCHREMPP et al. 2013; FULKERSON und KNAPP 2015; PANTKE 2018).

Obwohl auch die systemische medikamentöse Therapie, genau wie die chirurgischen Eingriffe, größtenteils nicht kurativ ist, sind die meisten Medikamente doch gut tolerabel und es kann zumindest häufig eine Remission oder zumindest ein stabiler Zustand ohne Progression erzielt werden (KNAPP und MCMILLAN 2013).

Eine lokale intravesikale Therapie, z. B. mit Mitomycin C, kann als Monotherapie oder in Kombination mit einer systemischen Behandlung durchgeführt werden (ABBO et al. 2010; FULKERSON und KNAPP 2015). Eine Tumorantwort konnte damit in 12/13 Fällen erzielt werden (ABBO et al. 2010).

Auch in der Tiermedizin wird der gezielten Krebstherapie („targeted cancer therapy“) zunehmend mehr Interesse entgegengebracht (FULKERSON und KNAPP 2015). Man verspricht sich davon Fortschritte in der onkologischen Therapie, um den größtmöglichen antitumorösen Effekt in Kombination mit dem geringsten toxischen Risiko zu erzielen (FULKERSON und KNAPP 2015). Bislang stehen in der Veterinärmedizin jedoch kaum Möglichkeiten einer personalisierten Krebstherapie zur Verfügung. Für Mastzelltumoren des Hundes, in deren Pathogenese Mutationen in den Exons 11, 8 und 9 beteiligt sind (LETARD et al. 2008), ist eine gezielte Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Masitinib beschrieben (HAHN et al. 2008; DUBREUIL et al. 2009).

2.2. Das kanine Prostatakarzinom

2.2.1. Ätiologie, Rassedisposition, Altersverteilung

Neben dem Menschen ist der Hund die einzige Spezies, in der häufig spontane Prostatakarzinome (PCa) beschrieben sind (TESKE et al. 2002; CHRISTENSEN 2018). Das kanine PCa ist eine hochaggressive und häufig metastasierende Neoplasie (CHRISTENSEN 2018; GRIFFIN et al. 2018), deren Inzidenz in der Literatur mit 0,2 – 0,6 % angegeben ist (WEAVER 1981; BELL et al. 1991; BRYAN et al. 2007). Anders als beim Menschen ist beim Hund aber wenig über die definitive Entstehung sowie die molekulare Pathogenese bekannt. Eine androgen-abhängige Entstehung, wie in der Humanmedizin beschrieben, ist beim Hund jedoch unwahrscheinlich (LEROY und NORTHROP 2009). Kastrierte Rüden zeigen im Vergleich zu unkastrierten sogar ein gesteigertes Risiko, an einem PCa zu erkranken (TESKE et al. 2002; SORENMO et al. 2003; BRYAN et al. 2007). Als Ursachen für das kanine PCa werden in der Literatur chromosomale Abnormalitäten und Aneuploidie diskutiert (MADEWELL et al. 1991; WINKLER et al. 2005; WINKLER et al. 2006). Eine Rasseprädisposition ist für den Mischling, Dobermann, Scottish Terrier, Beagle, Deutsch Kurzhaar, Airedale Terrier (BRYAN et al. 2007; EBERHARDT und KIEFER 2015) und den Bouvier de Flandres (TESKE et al. 2002) beschrieben. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind betroffene Rüden meist in einem Alter von 10 Jahren (Median) (CORNELL et al. 2000; TESKE et al. 2002; SORENMO et al. 2003).

2.2.2. Klinisches Bild

Die klinischen Symptome eines PCa umfassen seltener Harnabsatzstörungen (Dysurie, Hämaturie, Strangurie, Pollakisurie), jedoch häufig Kotabsatzstörungen (Dyschezie, Tenesmus, Konstipation) sowie in manchen Fällen Schmerzen im Lendenwirbelbereich bis hin zu einer Parese der Hintergliedmaßen (CORNELL et al. 2000; LEROY und NORTHROP 2009; AXIAK und BIGIO 2012). Prostatitiden im Rahmen von Sekundärinfektionen sind ebenfalls in vielen Fällen beschrieben (BELL et al. 1991). Zudem sind Lethargie, Anorexie, Leistungsintoleranz und Gewichtsverlust häufige klinische Symptome von Hunden mit PCa (CORNELL et al. 2000; LEROY und NORTHROP 2009). Bei Diagnosestellung sind bereits bei 44 % der Hunde Metastasen in der Lunge zu finden (BRYAN et al. 2007). Analog zum Menschen treten bei betroffenen Hunden häufig Knochenmetastasen im Lumbalbereich auf, die die beschriebenen Lahmheiten verursachen (AXIAK und BIGIO 2012; WEBER et al. 2017). Die mediane Überlebenszeit zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ohne Behandlung beträgt 30

Tage, wobei viele Hunde bereits bei Diagnosestellung euthanasiert werden (CORNELL et al. 2000; SORENMO et al. 2004).

2.2.3. Diagnostik

Bei der rektalen Untersuchung ist die Palpation der durch die Neoplasie veränderten Prostata oft schmerzhaft (SMITH 2008). Eine Vergrößerung kann vorliegen, ist aber nicht zwingend vorhanden (SMITH 2008). Bei kastrierten Rüden ist jedoch das Vorliegen eines PCa die häufigste Ursache einer Prostatamegalie (SMITH 2008). Die Form der Prostata ist meist unregelmäßig und die Konsistenz fester als bei gesunden Hunden (JOHNSON 2010; AXIAK und BIGIO 2012). In der Untersuchung des Harnsedimentes können sowohl eine Pyurie, Hämaturie, Bakteriurie als auch neoplastische Zellen gefunden werden (CORNELL et al. 2000).

Auf röntgenologischen Übersichtsaufnahmen von Thorax und Abdomen können v. a. eine mögliche Metastasierung sowie fokale Verkalkungen im Prostataparenchym beurteilt werden (BRADBURY et al. 2009). Derartige Verkalkungen sprechen beim kastrierten Rüden mit einer Spezifität von 100 % für das Vorliegen eines PCa (BRADBURY et al. 2009). In der Ultraschalluntersuchung kann eine Verdachtsdiagnose anhand heterogener Echogenität, einer marginalen unsymmetrischen Vergrößerung und fokalen Mineralisationen erhoben werden (FEENEY et al. 1987; EBERHARDT und KIEFER 2015; CHRISTENSEN 2018). Jedoch ist v. a. die Differenzierung zwischen einem PCa und einer chronischen Prostatitis in der sonographischen Untersuchung meist nicht möglich (EBERHARDT und KIEFER 2015). Für eine endgültige Diagnosestellung ist eine zytologische oder histologische Untersuchung notwendig. Die für eine zytologische Untersuchung wohl am häufigsten durchgeführte Probenentnahme ist die ultraschallgestützte Feinnadelaspiration (POWE et al. 2004). Das bei dieser Art der Probenentnahme oft diskutierte Risiko der Transplantation von Tumorzellen entlang des Stichkanals wird in der Literatur als geringgradig eingeschätzt (NYLAND et al. 2002; EBERHARDT und KIEFER 2015; RODAK et al. 2018). Alternativ kann Probenmaterial durch manuelle Ejakulation oder eine Prostatalavage mit manueller Massage gewonnen werden (KHADIDJA und ADEL 2017; RODAK et al. 2018). Eine Differenzierung zwischen einem PCa und einer chronischen Prostatitis ist aber auch in der zytologischen Untersuchung manchmal schwierig bis unmöglich (BELL et al. 1991; CORNELL et al. 2000). Zudem ist der Gehalt abgeschilfter neoplastischer Zellen des PCa im Urin meist sehr gering (BARSANTI und FINCO 1984). Der Goldstandard zur Diagnosestellung ist deshalb die histopathologische

Untersuchung einer Biopsie (POWE et al. 2004). Dies ist jedoch ein invasives, aufwendiges und kostspieliges Verfahren und nur unter Allgemeinanästhesie möglich.

Labordiagnostisch ist die Bestimmung der kaninen prostataspezifischen Esterase (CPSE) möglich (ALONGE et al. 2018a). Dabei handelt es sich um ein trypsin-ähnliches Enzym, welches vom Drüsengewebe der Prostata produziert wird und bei krankhaften Prozessen der Prostata im Serum erhöht ist (ALONGE et al. 2018a; ALONGE et al. 2018b). Es muss jedoch beachtet werden, dass der Serum-CPSE-Wert ausschließlich signifikant mit dem Prostatavolumen korreliert (PINHEIRO et al. 2017). Folglich ist dieser Wert für die Diagnostik einer benignen Prostatahyperplasie besser geeignet als für die Diagnosestellung eines PCa, bei dem eine Größenzunahme, wie bereits erwähnt, nicht zwingend ist (SMITH 2008). Wie für das ÜZCa des Hundes, wird auch für das kanine PCa die Messung der Calgranulinkonzentration im Urin als möglicher Screeningtest beschrieben (HEILMANN et al. 2017). Einen kommerziell erhältlichen Test hierfür gibt es bis jetzt aber auch für die Diagnostik des kaninen PCa nicht. Das Potenzial als früher diagnostischer Marker wurde für mehrere MicroRNAs beschrieben (KOBAYASHI et al. 2017). Deren Expression wurde jedoch bisher nur an Gewebeproben erforscht, weshalb wiederum eine invasive Probenentnahme ähnlich zur pathohistologischen Untersuchung erforderlich ist.

2.2.4. Makroskopisches, zytologisches und histopathologisches Bild

Makroskopisch lassen sich zwei Formen des kaninen PCa unterscheiden (FOSTER 2007). Dabei geht die offensichtlichere der beiden mit erhöhter Festigkeit, asymmetrischer Vergrößerung, partiellem oder komplettem Verlust der medianen Raphe, zystischer Aushöhlung der Prostata und Adhäsionen zwischen der Prostata und anderen anatomischen Strukturen der Beckenhöhle einher (FOSTER 2007). Bei der zweiten Form ist das Karzinom hauptsächlich um die Harnröhre lokalisiert und nur eine minimale Vergrößerung der Prostata ersichtlich (FOSTER 2007). Bei dieser Form findet auch eine nekrotische und zystische Aushöhlung der Prostata statt, es gibt häufig Fernmetastasen und klinisch treten Harnabsatzstörungen auf (FOSTER 2007).

Zytologisch sind oft große Zellverbände mit undeutlichen Zellgrenzen ersichtlich (SOLANO-GALLEGO und MASSERDOTTI 2016). Die Zellen selbst sind stark basophil und weisen häufig Vakuolen auf (SOLANO-GALLEGO und MASSERDOTTI 2016). Malignitätskriterien sind mittel- bis hochgradige Anisokaryose sowie eine Zunahme der Kerngröße und des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses (SOLANO-GALLEGO und MASSERDOTTI 2016). Die Zellkerne sind rund bis pleomorph, die Nucleoli groß, prominent und oft multipel (SOLANO-GALLEGO

2. Literaturübersicht

und MASSERDOTTI 2016). Zytologisch ist eine Unterscheidung der verschiedenen Prostatatumoren (v. a. Adenokarzinome und ÜZCa) schwierig (SOLANO-GALLEGO und MASSERDOTTI 2016). Auch die zytologische Diagnose eines PCa bei gleichzeitig vorliegender Entzündung kann aufgrund der sich überlagernden Bilder problematisch sein (BELL et al. 1991).

Die häufigsten histologischen Typen des kaninen PCa sind das Adenokarzinom und das ÜZCa (CORNELL et al. 2000). Dabei gehen Adenokarzinome vom Drüsengewebe und ÜZCa vom durch Übergangszellepithel ausgekleidetem Gangsystem der Prostata aus (LEROY und NORTHRUP 2009). Aber auch Plattenepithelkarzinome und Mischtumoren sind beschrieben (CORNELL et al. 2000). Laut Literatur zeichnen sich urethrale PCa histologisch v. a. durch das Fehlen glandulärer Charakteristika aus (KENNEDY 1998). Jedoch ist auch histologisch anhand kleiner Biopsien die Differenzierung der Ursprungszellen meist schwierig bis unmöglich (LEROY und NORTHRUP 2009).

In der Humanmedizin beruht das histologische Grading der PCa auf dem 1966 erstmals von Donald Gleason entwickelten Gleason-Score (GLEASON 1966). Dabei werden die zwei vorherrschenden histologischen Wachstumsmuster in der Neoplasie detektiert und je nach Differenzierungsgrad einem definierten Zahlenwert von 1 (gut differenziert = Muster/pattern 1) bis 5 (undifferenziert = Muster/pattern 5) zugeordnet. Der Gleason-Score ergibt sich aus der Summe der Werte der beiden vorherrschenden Wachstumsmuster (GLEASON und MELLINGER 1974) und kann somit maximal zehn betragen. Findet sich nur ein Wachstumsmuster, so wird der Wert des entsprechenden Musters multipliziert (GLEASON und MELLINGER 1974). Dabei spricht ein hoher Gleason-Score im humanem PCa für ein undifferenziertes Wachstum (GLEASON 1966), eine hohe Metastasierungsrate und eine geringe Überlebenszeit (KWELDAM et al. 2015). Über die Jahre wurde der Gleason-Score mehrfach modifiziert und die verschiedenen Wachstumsmuster neu den unterschiedlichen pattern 1 – 5 zugeordnet (DELAHUNT et al. 2012). Dadurch können mittlerweile sowohl ein früherer Diagnosezeitpunkt als auch eine modernere Untersuchungstechnik im aktuellen Gleason-Score für humane PCa berücksichtigt werden (EPSTEIN 2010).

Auch in der Tiermedizin zeigen die kaninen PCa eine erhebliche histomorphologische Heterogenität und verschiedene Wachstumsmuster können sowohl einzeln (62 %) als auch in Kombination (38 %) vorkommen (PALMIERI et al. 2014). Als vorherrschende histologische Wachstumsmuster sind im kaninen Adenokarzinom klein azinär/duktal, solide, kribriform (mit und ohne zentrale Nekrose (Komedonekrose)) und papillär beschrieben (PALMIERI et al. 2014). PALMIERI und GRIECO (2015) wandten erstmals den aus der Humanmedizin bekannten, modifizierten Gleason-Score aus dem Jahre 2005 auf das kanine PCa an. Sie

kamen zu dem Schluss, dass dieses Gradingssystem auch auf das PCa des Hundes übertragen werden kann, um die histopathologische Beurteilung zu ergänzen. Im Gegensatz zur Situation bei Männern, wo die meisten PCa einen Gleason-Score von 7 zeigen (HUANG et al. 2014), wurde beim Hund am häufigsten ein Gleason-Score von 10 festgestellt (PALMIERI und GRIECO 2015). Dementsprechend wurde das am wenigsten differenzierte Gleason Muster 5 auch in 73 % der untersuchten kaninen PCa gefunden (PALMIERI und GRIECO 2015). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls in 62 % der untersuchten PCa ein Gleason-Score von 10 diagnostiziert (DI DONATO et al. 2017). Diese Beobachtung reflektiert das, im Vergleich zum Mann, enorm aggressive Verhalten des kaninen Adenokarzinoms der Prostata (PALMIERI und GRIECO 2015).

2.2.5. Therapie

Durch eben dieses enorm aggressive Verhalten des kaninen PCa mit häufiger Metastasierung ist sowohl eine lokale als auch eine systemische Behandlung indiziert (LEROY und NORTHRUP 2009). Eine universell akzeptierte „standard of care“-Behandlung gibt es in der Veterinärnarkologie aber laut LEROY und NORTHRUP (2009) nicht. Die Behandlungsstrategien umfassen u. a. eine palliative Behandlung, um zum einen die Durchgängigkeit der harnableitenden Wege zu gewährleisten und zum anderen die mit Skelettmetastasen assoziierten Schmerzen zu lindern (GRIFFIN et al. 2018). Ferner sind die Gabe von COX-Inhibitoren und Chemotherapeutika sowie chirurgische Maßnahmen und die Radiotherapie beschrieben (GRIFFIN et al. 2018).

Chirurgisch wird bei Hunden mit intrakapsulärem Tumor eine Prostataektomie empfohlen (LEROY und NORTHRUP 2009). Die Kombination einer ergänzenden Therapie (Chemotherapie, Gabe von COX-Inhibitoren) mit einer totalen Prostataektomie verlängert dabei die Überlebenszeit erkrankter Hunde und verringert die Komplikationsrate dieser Operation (BENNETT et al. 2018). Laut VLASIN et al. (2006) ist aufgrund der längeren Überlebenszeit und der weniger häufig auftretenden Komplikationen die subtotale intrakapsuläre Prostataektomie der totalen vorzuziehen. Eine chirurgische Intervention bietet zwar die Möglichkeit der Linderung der klinischen Symptome eines PCa, geht aber mit einem hohen Risiko schwerer Komplikationen (hohe postoperative Morbidität, häufig Inkontinenz) ohne nennenswerte Verbesserung der Überlebenszeit einher (LEROY und NORTHRUP 2009).

Um in Fällen von durch das PCa bedingten Obstruktionen den Urinabfluss über die harnableitenden Wege schnell wiederherzustellen, kann eine transurethrale Resektion (in

2. Literaturübersicht

Kombination mit einer Chemotherapie und/oder einer Radiotherapie) durchgeführt werden (LIPTAK et al. 2004). Alternativ ist diesbezüglich auch das Einsetzen eines Stents möglich (WEISSE et al. 2006; AXIAK und BIGIO 2012).

Die Verabreichung von Chemotherapeutika (Carboplatin, Mitoxantron, Epirubicin, Vinblastin) ist zwar für das PCa des Hundes beschrieben (RAVICINI et al. 2018), wurde jedoch bis jetzt noch nicht genau untersucht, weshalb der wirkliche Nutzen auch nicht dokumentiert ist (LEROY und NORTHRUP 2009; CANNON und ALLSTADT 2015). Aufgrund der sehr hohen Metastasierungsrate sollte aber laut AXIAK und BIGIO (2012) eine systemische Chemotherapie für die Behandlung des kaninen PCa in Betracht gezogen werden. Eine weitere Möglichkeit der systemischen Behandlung sind COX-Inhibitoren (Piroxicam oder Carprofen), die signifikant die Lebenszeit der behandelten Hunde verlängern (6,9 gegen 0,7 Monate) (SORENMO et al. 2003). Eine Kombination von Chemotherapie und COX-Inhibitoren verbesserte laut RAVICINI et al. (2018) das Outcome (längere Überlebenszeit und Tumorprogression) von Hunden mit PCa signifikant. Die metronomische Chemotherapie (Cyclophosphamid, Chlorambucil) ist auch für das PCa beschrieben, zeigte aber keine statistisch signifikanten Behandlungserfolge im Vergleich zur alleinigen Gabe von COX-Inhibitoren (RAVICINI et al. 2018).

Der Einsatz von Bisphosphonaten, bei denen es sich um selektive Osteoklasteninhibitoren handelt, ermöglicht die palliative Linderung der durch Skelettmetastasen hervorgerufenen Schmerzen, die Verminderung der Frakturgefahr und die Kontrolle der Hyperkalzämie (FAN et al. 2005; LEROY und NORTHRUP 2009).

Auch die Radiotherapie wird, obwohl sie nicht gut erforscht ist und viele Nebenwirkungen zu beobachten sind, häufig angewandt (LEROY und NORTHRUP 2009; AXIAK und BIGIO 2012). Zur palliativen Linderung der klinischen Symptome sowie der durch Skelettmetastasen hervorgerufenen Schmerzen scheint die Radiotherapie dennoch effektiv zu sein (LEROY und NORTHRUP 2009; AXIAK und BIGIO 2012).

Unabhängig von der gewählten Therapie ist diese jedoch oftmals nicht kurativ und die meisten Behandlungsansätze sind palliativ (CUNTO et al. 2019).

2.3. Die BRAF-Variante V595E

Im Jahr 2002 wurde in humanen Neoplasien erstmals eine BRAF-missense-Mutation beschrieben, die mit einer Häufigkeit von 66 % in malignen Melanomen, 14 % in Ovarialtumoren und 12 % in kolorektalen Karzinomen vorkommt (DAVIES et al. 2002). Das BRAF-Gen ist Teil der Familie der RAF-Gene (RAF = Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), zu denen neben dem BRAF auch die Isoformen ARAF und CRAF gehören (MOCHIZUKI und BREEN 2015). Es handelt sich bei diesem Gen um eine Serin/Threonin-Kinase, die Teil des Ras-Raf-MEK-ERK-MAP-Kinase-Weges ist und die zelluläre Antwort auf Wachstumssignale im Sinne von Proliferations-, Zellzyklusarrest-, Differenzierungs- und Apoptosesignalen vermittelt (PEYSSONNAUX und EYCHÈNE 2001). Bei der Mutation des BRAF-Gens kommt es zu einem Austausch der Base Thymin gegen Adenin im Nukleotid 1796 des Exons 15, was zum Aminosäureaustausch von Valin gegen Glutamin in der Position 599 (V599E) des Chromosom 16 führt (DAVIES et al. 2002). Dieser Aminosäureaustausch imitiert eine Phosphorylierung, die eigentliche Aktivierung des BRAF-Gens, und führt so zu einer permanenten Aktivierung dieses Gens und dadurch zu unkontrolliertem Zellwachstum (DAVIES et al. 2002). Da der Nachweis nur aus Tumorzellen gelang, handelt es sich um eine somatische Mutation und nicht um eine sog. Keimbahnmutation, die in allen Körperzellen eines Individuums nachweisbar wäre (DAVIES et al. 2002).

MOCHIZUKI et al. (2015a) untersuchten die Existenz der BRAF-Mutation in einer Vielzahl von Neoplasien des Hundes. Sie fanden, analog zur humanen BRAF-Mutation, eine einzelne Thymin-zu-Adenin-Transversion, die ebenfalls zum Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutamin führt (MOCHIZUKI et al. 2015a). Anders als beim Menschen ist die BRAF-Mutation des Hundes im Nukleotid 1349 lokalisiert und betrifft das Codon 450 (V450E) (MOCHIZUKI et al. 2015a). Aufgrund unterschiedlicher Referenzsequenzen werden die Bezeichnungen V595E und V450E in der Literatur synonym für die identische Mutation im kaninen Genom benutzt (MOCHIZUKI und BREEN 2015). Deshalb wird im Weiteren, um Verwechslungen vorzubeugen, auch immer von der BRAF-Mutation V595E gesprochen. MOCHIZUKI et al. (2015a) fanden mittels Sanger-Sequenzierung die BRAF-Mutation in 9,6 % der untersuchten primären Neoplasien des Hundes. Dabei dienten als Probenmaterialien sowohl frische als auch formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben.

Anders als beim Menschen fanden MOCHIZUKI et al. (2015a) die BRAF-Mutation am häufigsten in Prostatakarzinomen (80 %) und Übergangszellkarzinomen (67 %), aber nur selten in peripheren Nervenzelltumoren (22 %), melanozytären Tumoren (17 %) und Gliomen (15 %) des Hundes. In endokrinen Pankreastumoren (HINTERLEITNER 2005), oralen malignen Melanomen (HINTERLEITNER 2005; SHELLY et al. 2005),

2. Literaturübersicht

Schilddrüsenkarzinomen (CAMPOS et al. 2014) sowie in hämatopoetischen Tumoren und Sarkomen des Hundes konnte die BRAF-Mutation nicht nachgewiesen werden (MOCHIZUKI und BREEN 2015).

Untersuchungen hinsichtlich der Spezifität der BRAF-Mutation für das kanine ÜZCa zeigten, dass der Nachweis der BRAF-Mutation zu 100 % spezifisch für das Vorliegen eines ÜZCa im Hund ist (MOCHIZUKI et al. 2015b). Studien bezüglich der Spezifität der BRAF-Mutation im kaninen PCa gab es bis zur vorliegenden Arbeit nicht.

Hinsichtlich der Sensitivität des Nachweises der BRAF-Mutation in kaninen ÜZCa erstrecken sich die Angaben je nach Studie und angewandter Detektionstechnik (Sanger-Sequenzierung bis droplet digital PCR (ddPCR)) von 54,5 % (MAEDA et al. 2018) über 67 % und 75 % (MOCHIZUKI et al. 2015a; MOCHIZUKI et al. 2015b) bis hin zu 87 % (DECKER et al. 2015).

Untersuchungen auf das Vorliegen der BRAF-Mutation aus nicht-invasiv gewonnenen Urinproben erzielten gute Ergebnisse in der Diagnostik des kaninen ÜZCa und PCa (DECKER et al. 2015; MOCHIZUKI et al. 2015b). Durch die Sanger-Sequenzierung und die ddPCR konnte die BRAF-Mutation in 61 % der mittels Zytologie oder Histologie diagnostizierten ÜZCa und in 100 % der PCa auch im Urin nachgewiesen werden, wobei die ddPCR eine höhere Sensitivität als die Sanger-Sequenzierung erreichte (MOCHIZUKI et al. 2015b). Laut GRIFFIN et al. (2018) ist ein positiver Nachweis der BRAF-Mutation aufgrund der 100 %igen Spezifität beweisend für das Vorliegen eines kaninen ÜZCa oder PCa und der Test gilt als wertvolles minimalinvasives Diagnostiktool.

Bis dato wurde in keiner Studie das Auftreten der BRAF-Mutation in ÜZCa und PCa von Hunden der europäischen Population untersucht. Ein Nachweis der BRAF-Mutation aus zytologischen Ausstrichen war bislang weder für das ÜZCa noch für das PCa des Hundes etabliert. Auch wurden in keiner der durchgeführten Studien die untersuchten ÜZCa bzw. PCa genauer histologisch oder immunhistologisch charakterisiert.

In kolorektalen Karzinomen des Menschen ist ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis der BRAF-Mutation, dem histologischen Bild und der COX-2-Expression beschrieben (JIN et al. 2018). Ob dies auch auf das kanine ÜZCa und PCa übertragen werden kann, wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls in keiner der Studien untersucht.

In der Humanmedizin dient der Nachweis der BRAF-Mutation bei Melanomen des Menschen als Ansatzpunkt für eine gezielte, personalisierte Krebstherapie mit RAF-Inhibitoren (CHAPMAN et al. 2011). Der Nachweis der BRAF-Mutation in kaninen ÜZCa und PCa könnte zukünftig auch in der Veterinärmedizin eine Chance darstellen, eben diese personalisierte Therapie zu ermöglichen. In einer ersten Studie an kaninen ÜZCa-Zelllinien (DECKER et al.

2015) zeigt der RAF-Inhibitor Vemurafenib gute Resultate und auch erste klinische In-vivo-Tests sind vielversprechend (KNAPP 2018).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Ziele und Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen

Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Methode des Nachweises der BRAF-Mutation erstmals auch für zytologische Ausstriche von ÜZCa und PCa zu etablieren sowie die Prävalenz dieser Mutation in den beiden genannten Neoplasien der europäischen Hundepopulation zu detektieren. Außerdem sollte der Zusammenhang zwischen dem Nachweis der BRAF-Variante V595E und dem histologischen Bild der kaninen ÜZCa und PCa untersucht werden. Im ÜZCa des Hundes wurde zudem der Zusammenhang zwischen der BRAF-Mutation und der COX-2-Expressionsintensität geprüft. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Studie 2, aufgrund der bekannten Rassedisposition von Terriern für das ÜZCa, im Rassevergleich zwischen Terriern und anderen Rassen betrachtet.

Dabei sollten insbesondere die folgenden Fragestellungen in Studie 1 behandelt werden:

- Kann die Methodik des Nachweises dieser Mutation für verschiedene Materialien der Routinediagnostik (Paraffinmaterial, zytologische Ausstriche, Urin) etabliert werden? Wenn ja, wie hoch ist die Spezifität?
- Ist die BRAF-Mutation auch in ÜZCa des eigenen Patientengutes der europäischen Hundepopulation nachweisbar? Wenn ja, wie hoch liegt dabei die Sensitivität?

Im Rahmen der Studie 2 sollten die folgenden Fragestellungen geklärt werden:

- Gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten der BRAF-Variante V595E und dem histologischen Grad des kaninen ÜZCa der Harnblase?
- Gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten der BRAF-Mutation und der Intensität der COX-2-Expression in dieser Neoplasie?
- Gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem histologischen Grad und der immunhistologischen COX-2-Expressionsintensität im kaninen ÜZCa der Harnblase?
- Gibt es signifikante Unterschiede im histologischen Grad, der Intensität der COX-2-Expression und dem Auftreten der BRAF-Variante V595E zwischen Terriern und anderen Rassen im kaninen ÜZCa der Harnblase?

3. Eigene Untersuchungen

In der 3. Studie lauteten die Fragestellungen:

- Kann die Methode des Nachweises der BRAF-Variante V595E auch für zytologische Ausstriche von Prostatafeinnadelaspiraten etabliert werden?
- Wie hoch ist die Spezifität des Nachweises der BRAF-Variante V595E für das kanine PCa im eigenen Patientengut der europäischen Hundepopulation?
- Wie hoch ist die Sensitivität dieser Mutation für das kanine PCa in diesem Patientengut?
- Besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten der BRAF-Variante V595E und dem histologischen Grading des PCa des Hundes?

3.2. Zusammenstellung der eigenen Publikationen

Eigenanteilbeschreibung:

In der durchgeführten Studie 1 war ich an der Literaturrecherche beteiligt, habe die Proben mit ausgewählt, ausgewertet und war abschließend am Schreiben der Publikation beteiligt.

Die durchgeführten Studien 2 und 3 habe ich mit geplant, das Probenmaterial ausgesucht und ausgewertet. Zudem habe ich die makroskopischen und histologischen Fotografien der Gewebe angefertigt, die Publikationen geschrieben und die Tabellen erstellt.

Herr Prof. Dr. Robert Klopffleisch aus dem Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin war Leiter und fachlicher Begleiter der Studien. Außerdem wirkte er an der Anfertigung der Publikationen mit.

Frau PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach aus der Firma LABOKLIN GmbH & Co. KG hat an der Planung der Studien mitgewirkt und diese fachlich begleitet. Zudem war sie an der Auswertung der Ergebnisse sowie der Anfertigung der Publikationen beteiligt.

Frau Sophie Merz aus dem Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin war an der statistischen Auswertung der Ergebnisse beteiligt.

Frau Alexandra Kehl und Frau Hanna Erhard aus der Firma Laboklin GmbH & Co. KG haben die genetischen Analysen durchgeführt und waren an der molekulargenetischen Auswertung der Proben beteiligt.

3.2.1. Studie 1: Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Biopaten beim kaninen Übergangszellkarzinom. AUPPERLE-LELLBACH H, GRASSINGER J, HOHLOCH C, KEHL A, PANTKE P. Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2018 Oct; 46(5):289-295. doi: 10.15654/TPK-180554.

<https://doi.org/10.15654/TPK-180554>

Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Biopaten beim kaninen Übergangszellkarzinom

Heike Aupperle-Lellbach¹; Julia Grassinger¹; Corinna Hohloch¹; Alexandra Kehl¹; Peter Pantke²

¹Laboklin GmbH & Co KG, Bad Kissingen; ²AniCura Bielefeld GmbH, Tierärztliche Klinik für Kleintiere

Schlüsselwörter

Übergangszellkarzinom, Hund, Mutation, Molekulargenetik, Gentest, Tumormarker

Zusammenfassung

Gegenstand und Ziel: Übergangszellkarzinome (ÜZCa) sind die häufigsten malignen Tumoren der harnableitenden Wege beim Hund. In früheren Studien wurde mittels DNA-Sequenzierung in Urinproben, Gefrier- und Paraffinmaterial von Harnblasenbiopaten die Mutation im BRAF-Gen V595E bei bis zu 85 % der kaninen ÜZCa in den Tumorzellen identifiziert. Ziel der eigenen Arbeit war, diese Methode für zytologische Ausstriche zu etablieren und die Prävalenz dieser Mutation im eigenen Kollektiv zu untersuchen. **Material und Methoden:** Es wurden 43 formalinfixierte Biopate, 48 Urinproben und/oder 31 zytologische Ausstriche von 66 Hunden mit ÜZCa (n = 33), Harnblasenpolypen (n = 7), Zystitis (n = 23) oder ohne Harnblasenerkrankung (n = 3) analysiert. Die DNA-Isolierung erfolgte mit kommerziell erhältlichen Testkits. Das Exon 15 wurde mittels Sanger-Sequenzierung auf das Vorliegen der BRAF-Mutation c.1784T>A untersucht. **Ergebnisse:** Aus 39/43 Paraffinproben, 38/48 Urinproben und 16/18 zellreichen Ausstrichen ließ sich eine ausreichende Menge auswertbarer DNA isolieren. Bei 10/13 zellarmen Ausstrichen reichte die DNA für eine aussagefähige PCR nicht aus. In allen Fällen, in denen verschiedene Materialien vorlagen, stimmten die Ergebnisse der BRAF-Genanalyse in den Paraffin-, Urin- und/ oder Zytologieproben des jeweiligen Hundes überein, sofern sich DNA isolieren ließ. Bei 22/31 Hunden (70,9 %) mit einem ÜZCa wurde die Mutation festgestellt, während sie bei keinem Hund mit Zystitis, Polypen oder ohne Harnblasenveränderung gefunden wurde. **Schlussfolgerung und klinische Relevanz:** Die Untersuchung auf Vorliegen einer BRAF-Variante stellt ein gutes neues Verfahren dar, mit dem sich in Zweifelsfällen die Verdachtsdiagnose eines ÜZCa häufig absichern lässt. Für die Methode eignen sich alle nicht invasiv gewonnenen, zellreichen Materialien wie Ausstriche von Urinsediment oder Ansaugbiopate sowie formalinfixierte Biopate. Aber nur der positive Befund ist beweisend. Hinsichtlich der prognostischen und therapeutischen Relevanz sowie der Möglichkeiten einer Frühdiagnostik von ÜZCa mittels der BRAF-Mutationsanalyse bedarf es weiterer Untersuchungen.

3. Eigene Untersuchungen

Keywords

Transitional cell carcinoma, dog, mutation, molecular genetics, genetic test, tumour marker

Summary

Objective: Transitional cell carcinoma (TCC) is the most common malignant tumour of the canine urinary tract. Previously, the mutation of the BRAF gene V595E was identified in approximately 85 % of canine TCC cases by DNA sequencing of TCC tumour cells, both in frozen and paraffin-embedded tissue sections, as well as in urine. The objective of this study was to establish these methods in cytological smears and to investigate the prevalence of BRAF mutation V595E in canine TCC in our cohort of patients. **Material and methods:** Biopsy samples (n = 43), urine (n = 48) and/or cytological smears (n = 31) from 66 dogs with TCC (n = 33), urinary bladder polyps (n = 7), cystitis (n = 23) or without bladder diseases (n = 3), submitted for routine diagnostics, were selected. DNA isolation from paraffin material, urine and cytological smears was performed using commercially available kits. Exon 15 was examined for the presence of the BRAF mutation c.1784T>A by Sanger sequencing. **Results:** In 39/43 paraffin-embedded biopsies and 38/48 urine samples, a sufficient amount of good quality DNA was isolated. DNA isolation and sequencing were successful in 16/18 smears with a high cell count, but not in the 10/13 smears with low cellularity. In all cases from which different sample materials were available, the results of BRAF analysis were identical in paraffin-embedded tissue, cytological smears and/or urine. In 22/31 dogs (70.9 %) with TCC, the presence of the BRAF mutation was confirmed, whereas it could not be detected in animals without pathological findings or with cystitis or with a polyp. **Conclusion and clinical relevance:** BRAF mutation analysis is a new and good method to be able to mostly confirm a diagnosis of TCC in uncertain cases. Non-invasive diagnostic samples, including urine and urine sediment containing sufficient numbers of relevant cells as well as cytology aspirates and formalin-fixed biopsies can be used for analysis. However, it is important to note that only a positive identification of the mutation is diagnostic. Further research is necessary to investigate prognostic and therapeutic relevance of the variant and how this genetic analysis can be used as an early detection method for TCC.

Einleitung

Übergangszellkarzinome (ÜZCa) sind die häufigsten malignen Tumoren der harnableitenden Wege beim Hund (7). Es ist eine ausgeprägte Rassedisposition für Terrierrassen und eine Geschlechtsdisposition für Hündinnen beschrieben (10). Die klinischen Symptome wie Strangurie, Pollakisurie oder Hämaturie ähneln dem Krankheitsbild einer Zystitis (20). Die klinische Verdachtsdiagnose basiert meist auf dem Signalement, klinischen Befunden und den Resultaten bildgebender Verfahren (4, 8). Zytologische Präparate, formalinfixierte Biopate oder Tumorexzisate der Harnblase oder Harnröhre dienen der detaillierten Charakterisierung der Histogenese und Dignität sowie der differenzialdiagnostischen Abgrenzung von Entzündungen (20). Bei benignen oder niedrigmalignen Tumoren lassen sich die zytologischen Malignitätskriterien allerdings nicht immer eindeutig von einer reaktiven epithelialen Pleomorphie und Dysplasie im Rahmen von Entzündungen unterscheiden (7, 23). Dann ist eine histologische Untersuchung von Biopaten notwendig, um ein ÜZCa sicher zu diagnostizieren und von Polypen oder anderen Tumoren der Harnblase (14) abzugrenzen. Für die Biopsie sind invasive und kostspielige Methoden unter Anästhesie erforderlich. Diese Verfahren können durch Größe, Alter und Geschlecht der einzelnen Hunde bzw. die apparative Ausstattung der Tierarztpraxis limitiert sein (2).

Verfahren, die keine invasive Probenentnahme erfordern, wie die Detektion von Veterinary Bladder Tumour Antigen (V-BTA) im Urin, besitzen eine eingeschränkte Aussagekraft, da bereits geringe Blutbeimengungen (z. B. aufgrund einer Zystitis oder iatrogen) zu einem falsch positiven Ergebnis führen können (1). Eingefrorener Harn oder Urin mit Autolyse der Zellen und bakterieller Überwucherung ist nicht auswertbar (Herstellerangaben, MEGACOR Diagnostik GmbH, A-6912 Hörbranz). Untersuchungen zur Microsatellite Instability (MSI) als diagnostischem Marker für das

3. Eigene Untersuchungen

kanine Übergangszellkarzinom ergaben eine nicht ausreichende Spezifität (68 %) und Sensibilität (55 %) (22). MicroRNA-Analysen konnten die Gene miR-103b und miR-16 als mögliche diagnostische Parameter identifizieren, deren Expression im Urin und Blut bei kaninem ÜZCa geringer war als bei gesunden Hunden oder solchen mit anderen Erkrankungen der unteren Harnwege. Allerdings ist sehr frisches oder bei -80°C gefrorenes Material für diese aufwendige Methode unabdingbar, sodass sie sich nicht zur routinemäßigen Diagnostik einsetzen lässt (9). Calgranuline wurden ebenfalls als mögliche diagnostische Marker für die Diagnose von Übergangszellkarzinomen des Hundes beschrieben (6), doch wird bislang kein entsprechendes Verfahren angeboten.

Mochizuki et al. (17, 18) konnten aus Tumorzellen kaniner ÜZCa in Gefrier- und Paraffinmaterial sowie im Urin die BRAF-Variante V595E (bezugnehmend auf die cBRAF-Referenzsequenz: ENSCAFT0000006306) nachweisen, die der BRAF-Variante V600E beim Menschen entspricht (3). Diese Mutationen bewirken bei beiden Spezies jeweils einen Aminosäureaustausch von Valin zu Glutaminsäure (17). Zu der Familie der RAF-Gene (RAF = Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) gehören die Isoformen ARAF, BRAF und CRAF. Die konstitutiv aktivierende Mutation des BRAF-Gens führt über die RAF-Proteine (Serin/Threonin-Kinasen) zu einer Aktivierung der Signal-Transduktionskaskade des MAP-Kinase-Weges, die eine abnorme Proliferation und Dedifferenzierung der betroffenen Zellen zur Folge hat (5). Die BRAF-Mutation c.1784T>A war in 54,5 % (12) bis 85 % der Übergangszell- und Prostatakarzinome (16–18), aber nur selten in melanozytären Tumoren, Nervenscheidentumoren, Gliomen und einzelnen anderen Karzinomen des Hundes nachweisbar (16). In den untersuchten hämatopoetischen Tumoren oder Sarkomen wurde die Mutation nicht gefunden (16). Im Gegensatz zum Hund kommt die Mutation des BRAF-Gens beim humanen ÜZCa nur selten (1 %) vor. Aber sie ist in zahlreichen anderen Neoplasien (Melanomen, Schilddrüsen-, Lungen-, Darmkarzinomen) des Menschen nachweisbar (15) und das Ziel spezifischer Therapieansätze in der humanmedizinischen Onkologie (19).

Ziel der aktuellen Arbeit war, kanine Übergangszellkarzinome hinsichtlich des Auftretens der BRAF-Mutation V595E im eigenen Patientengut zu untersuchen und dabei die Methodik für verschiedene Materialien der Routinediagnostik (Paraffinmaterial, zytologische Ausstriche, Urin) zu etablieren, um die nichtinvasive Diagnostik des ÜZCa beim Hund zu verbessern.

Material und Methoden

Probenmaterial

Zur Untersuchung gelangten 43 formalinfixierte Bioptate der Harnblase, 48 Urinproben und/oder 31 zytologische Ausstriche (Urinsediment, Ansaugbioptate) von insgesamt 66 Hunden mit einer Zystitis ($n = 23$), einem Harnblasenpolypen ($n = 7$), einem Übergangszellkarzinom ($n = 33$) oder ohne pathologische Veränderungen ($n = 3$), die in den Jahren 2017 und 2018 zur Routinediagnostik eingesandt wurden. Alle Bioptate (endoskopisch oder mittels Exzision gewonnene Gewebeproben) wurden in Formalin fixiert eingesandt. Den vorberichtlichen Angaben zu den anderen Proben war fast nie zu entnehmen, wie diese gewonnen wurden (Spontan- oder Zystozenteseurin, Ansaugbioptate oder Urinsedimentausstrich o. a.). Bei eingegangenen Urinproben wurde ein zusätzliches Zytocentrifugationspräparat (s. u.) angefertigt. Im Weiteren werden die direkt eingesandten und die im eigenen Labor angefertigten Präparate als „zytologische Ausstriche“ zusammengefasst. Die Hunde (18x Terrierrassen, 18x Mischlinge, 5x Labrador, 4x Dackel, 21x andere Rassen) waren 0,5–17 Jahre alt (Median 10 Jahre). Es handelte sich um 15 weibliche, 21 weiblich-kastrierte, 18 männliche und 12 männlich-kastrierte Tiere.

Aufbereitung und Untersuchung der Proben

Die Gewebeproben wurden routinemäßig in Paraffin eingebettet und mittels Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die histologische Graduierung der Harnblasentumoren erfolgte nach Patrick et al. (21). Urinproben wurde bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert, das Sediment (5 μl) auf Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Wenn sich der Urin als zellarm erwies, wurden zusätzliche Präparate mittels Zytocentrifugation (150 μl , 700 g für 5 Minuten) angefertigt, um die Zellzahl auf dem

3. Eigene Untersuchungen

Objektträger zu erhöhen. Die im eigenen Labor angefertigten Ausstriche sowie die ungefärbt eingesandten zytologischen Präparate wurden mittels Haema-Schnellfärbung (Labor, Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin LT002–004) gefärbt. Alle Ausstriche unterlagen einer routinemäßigen diagnostischen Beurteilung und ihr Gehalt an Übergangsepithelzellen wurde dokumentiert. Als „zellarm“ galten Ausstriche mit 0–5 Epithelzellen in einzelnen Gesichtsfeldern bei Verwendung des 10er Objektivs (Abb. 1 a). Die zellreichsten Areale wurden jeweils für die PCR gekennzeichnet. Als optimal „zellreich“ wurden Ausstriche eingestuft, die bei Betrachtung mit dem 10er Objektiv in mehreren Gesichtsfeldern mehr als 20 Epithelzellen aufwiesen (Abb. 1 b). Ein Zellgehalt dazwischen galt als „mäßig“.

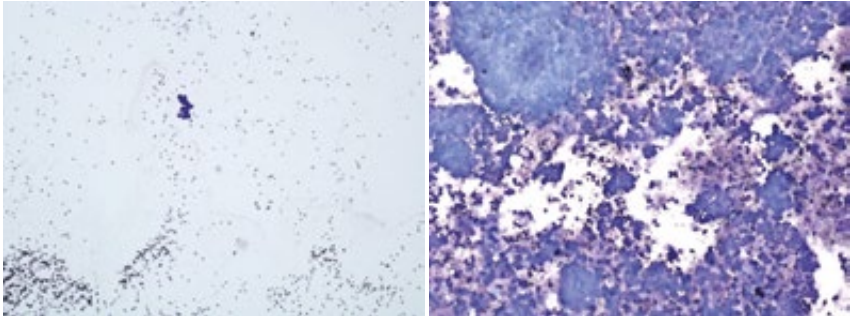


Abb. 1 a) Zytozentrifugationspräparat eines „zellarmen“ Urins mit einem kleinen Epithelzell-cluster neben einigen Erythrozyten – eine zu geringe Zellzahl für eine BRAF-Mutationsanalyse am Ausstrich. (10x Objektiv).
b) „Zellreicher“ Ausstrich, der so dick ist, dass sich die Morphologie der Epithelzellverbände nicht beurteilen lässt – eine typische Indikation für die BRAF-Mutationsanalyse. (10x Objektiv). (© H. Aupperle-Lellbach).

Fig. 1 a) Slide from the cyto centrifugation of urine with low cellularity containing only one small cluster of epithelial cells next to some erythrocytes – cell count too low for BRAF mutation analysis of the smear. (10x objective).
b) Thick smear with a high cell count where detailed morphological features of epithelial clusters are blurred – a typical case in which BRAF mutation analysis is indicated. (10x objective). (© H. Aupperle-Lellbach).

Für die molekulargenetischen Analysen wurde von den Paraffinblöckchen der Bioplate Material abgehobelt und die DNA mittels QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Produkt-Nr. 56404; Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstelleranleitung isoliert. Die Zellen der zytologischen Präparate wurden mithilfe eines in PBS-Puffer getränkten Tupfers abgenommen. Die DNA aus dem Urinsediment und von den zytologischen Ausstrichen wurde jeweils mittels MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) und MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Produkt-Nr. 06543588001; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) nach Herstelleranleitung isoliert.

Das Exon 15 wurde auf das Vorliegen der Mutation (BRAF Variante c.1784T>A) mittels Sanger-Sequenzierung untersucht: Die PCR-Amplifikation erfolgte mittels eines FastStart Mastermix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) und den von Mochizuki et al. (17) genannten Primern. Die PCR-Produkte wurden mittels MinElute PCR Purification Kit (Produkt-Nr. 28104; Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstelleranleitung aufgereinigt. Die Sequenzierreaktion wurde mittels BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Produkt-Nr. 4337454; ThermoFisherScientific, Darmstadt, Germany) durchgeführt und das Material mittels DyeEx 2.0 Spin Kit (Produkt-Nr. 63204; Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstelleranleitung aufgereinigt. Die Analyse erfolgte auf dem Genetic Analyser 3130 (ThermoFisherScientific, Darmstadt, Germany) und die Auswertung der Sequenzen mittels der Software SeqScanner.

3. Eigene Untersuchungen

Ergebnisse

Aus 39/43 formalinfixierten Biopaten ließ sich eine ausreichende Menge einer qualitativ gut auswertbaren DNA isolieren. Bei 16 von 18 als „zellreich“ dokumentierten zytologischen Ausstrichen funktionierten DNA-Isolierung und Sequenzierung ebenfalls gut, bei 10/13 „zellarmen“ zytologischen Ausstrichen reichte die DNA für eine aussagefähige PCR jedoch nicht aus. Aus 38/48 Urinproben war DNA zu isolieren. In acht Fällen wurde aus Urinsediment ausreichend DNA gewonnen, nicht aber aus den korrespondierenden zellarmen Ausstrichen. In allen Fällen, in denen verschiedene Materialien verfügbar waren (Urin + Zytologie + Biopsie n = 26, Urin + Biopsie n = 7, Urin + Zytologie n = 3, Zyto + Biopsie n = 1), stimmten die Ergebnisse der BRAF-Analyse des jeweiligen Hundes stets überein, sofern sich DNA isolieren ließ. Übergangszellkarzinome lagen bei 33 Hunden (9x weiblich, 12x weiblich-kastriert, 5x männlich, 7x männlich-kastriert) im Alter von 8 bis 17 Jahren (Median 11 Jahre) vor.

Die Tumoren wurden histologisch und/oder zytologisch diagnostiziert, je nachdem, welches Material zur Verfügung stand (Tab. 1). Die Tumoren in den 20 formalinfixierten Biopaten wurden graduiert (Tab. 1). Von zwei Tieren mit ÜZCa ließ sich keine DNA aus den formalinfixierten Biopaten isolieren. Bei 22 der übrigen 31 Hunde (70,9 %) konnte das Vorliegen der Mutation (V595E) festgestellt werden (Abb. 2a). Bei neun Hunden mit Übergangszellkarzinom war die Mutation nicht nachweisbar (Abb. 2b). Eine Alters- oder Rassedisposition hinsichtlich des Auftretens der Mutation war nicht erkennbar (Tab. 1).

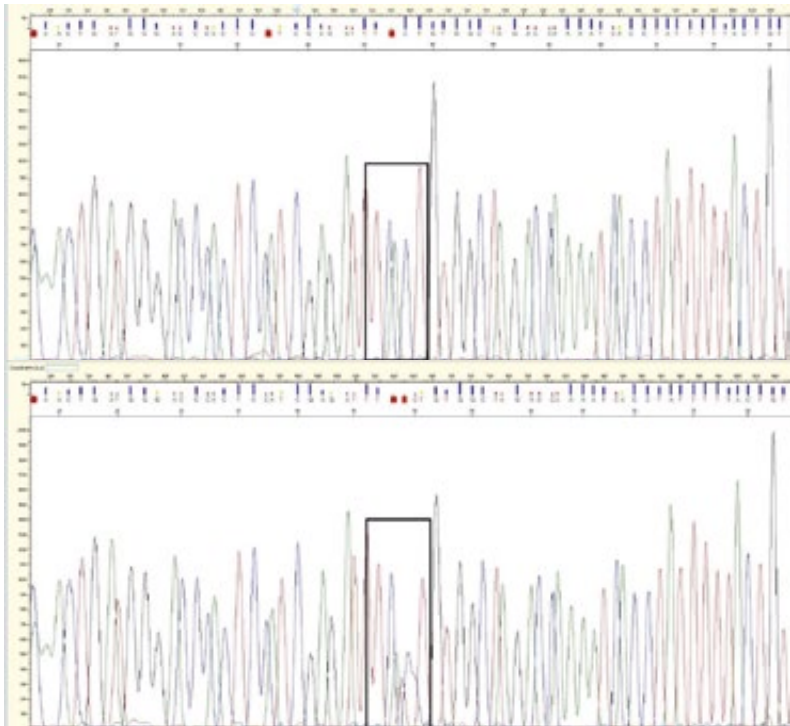


Abb. 2 Sanger-Sequenzierung des Exon 15 des BRAF-Gens. Elektropherogramm eines Hundes ohne (a) bzw. mit (b) der Mutation V595E, c.1784T>A (Rahmen) (© A. Kehl).

Fig. 2 Sanger sequencing of exon 15 of the BRAF gene. Electropherogram from a dog (a) without or (b) with the mutation V595E, c.1784T>A (boxed) (© A. Kehl).

3. Eigene Untersuchungen

Tab. 1 Signalement, Einsendungsmaterial der Hunde mit Übergangszellkarzinom sowie deren histologischer Grad und BRAF-Genotyp.

Table 1 Signalment, submitted material from dogs with transitional cell carcinoma, histological grading and BRAF genotype.

Nummer	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Material	ÜZCa Grading (der Biopate)	BRAF Genotyp
1	Australian Shepherd	9	wk	B	I	TT
2	Mix	10	mk	B, U, Z	I	TT
3	Franz. Bulldogge	10	w	B, U	II	TT
4	JRT-Mix	13	wk	B, U, Z	II	TT
5	Mix	8	wk	B, U, Z	III	TT
6	Mix	13	wk	B, U, Z	III	TT
7	Mix	10	m	B, U	III	TT
8	BSH	10	w	Z		TT
9	JRT	13	wk	U		TT
10	Magyar Vizsla	11	wk	B, U	I	TA
11	Rottweiler	10	wk	B, U, Z	I	TA
12	Basenji	12	w	B, Z, U	II	TA
13	JRT	12	wk	B, U, Z	II	TA
14	JRT	12	w	B	II	TA
15	Lhasa Apso	9	w	B, U, Z	II	TA
16	Magyar Vizsla	11	wk	B, U, Z	II	TA
17	Mix	14	mk	B, U, Z	II	TA
18	Mix	13	w	B	II	TA
19	Terrier	10	wk	B	II	TA
20	Beagle	12	wk	B	III	TA
21	JRT	17	mk	Z		TA
22	JRT	11	w	Z		TA
23	Labrador	8	m	Z		TA
24	Mix	11	mk	U		TA
25	Mix	12	mk	U		TA
26	Mix	14	mk	U		TA

3. Eigene Untersuchungen

27	Mix	11	mk	Z		TA
28	Mix	11	w	U		TA
29	Terrier	12	m	U		TA
30	WHWT	11	m	U		TA
31	Wolfspitz	14	m	U		TA
32	Mix	15	wk	B	I	keine DNA
33	Mix	12	w	B	II	keine DNA

BSH = Berner Sennenhund, JRT = Jack Russell Terrier, WHWT = West Highland White Terrier, m = männlich, mk = männlich kastriert, w = weiblich, wk = weiblich kastriert, B = Biopat, U = Urinsediment, Z = zytologischer Ausstrich, TT = Normalbefund, TA = Mutation V595E

Polypen wurden bei 7 Hunden (1x weiblich, 5x männlich, 1x männlich-kastriert) im Alter von 4 bis 14 Jahren (Median 7 Jahre) diagnostiziert. Es waren die folgenden Rassen vertreten: 3x Dackel, 1x Terrier, 1x Podenco, 1x Kooikerhondje, 1x Labrador. Bei keinem der Hunde mit einem Polypen ließ sich die BRAF-Mutation nachweisen. Zystitiden wurden bei 23 Hunden (5x weiblich, 8x weiblich kastrierte, 7x männlich und 3x männlich-kastriert) diagnostiziert, die 0,5 bis 14 Jahre alt waren (Median 9 Jahre). Sie gehörten folgenden Rassen an: 6x Terrierrassen, 5x Mischling, 3x Labrador, 2x Mops und 7x sonstige Rassen. Der dominierende Charakter der Zystitis war 11x hämorrhagisch, 4x eitrig, 2x ulzerativ, 5x gemischtzellig und 1x chronisch folliculär. Bei den 23 Hunden mit einer Zystitis und den drei Proben ohne besonderen Befund konnte die BRAF-Mutation nicht identifiziert werden. Die Befunde sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2 Häufigkeit des Nachweises der BRAF-Mutation V595E (c.1784T>A) bei verschiedenen Befunden der harnableitenden Wege des Hundes.

Table 2 Frequency of the detection of the BRAF mutation V595E (c.1784T>A) in various findings in the canine lower urinary tract.

	ÜZCa (n=31)	Polyp (n=7)	Zystitis (n=23)	o. b. B. (n=3)
Homozygot TT (normal)	9	7	23	3
Heterozygot TA (Mutation)	22	0	0	0

Diskussion

Die von Mochizuki et al. (17, 18) publizierten Methoden konnten im Rahmen dieser Studie etabliert werden, sodass sie zur Diagnose an allen routinemäßig eingesandten Materialien (formalinfixierte Biopate, Ausstriche, Urin) einsetzbar sind, sofern diese eine ausreichende Menge relevanter Übergangsepithelzellen beinhalten.

Erfahrungsgemäß ist der Epithelzellgehalt im Urin bei Vorliegen einer Zystitis oder eines Karzinoms, aber auch bei Polypen erhöht, da dann vermehrt Zellen abgeschilfert werden, während im Urinsediment gesunder Tiere nur wenige Zellen vorhanden sind (23). Bei Vorliegen einer sonographisch sichtbaren Masse in der Harnblase empfiehlt sich eine Ansaugbiopsie (23).

Die Untersuchung auf die BRAF-Mutation ist vor allem auch dann sinnvoll, wenn die Präparate eine unzureichende Qualität aufweisen (z. B. zu dick, bakteriell überwuchert, Quetschartefakte) oder sich die Relevanz geringer Malignitätsmerkmale bei gleichzeitiger Entzündung nicht beurteilen lässt.

In den amerikanischen Publikationen war bei 67 % (17), 83 % (18) bzw. 87 % (3) der kaninen Übergangszellkarzinome die Mutation des BRAF-Gens nachweisbar. Maeda et al. (12) konnten die Mutation V595 im BRAF-Gen nur in 6/11 Fällen (54,5 %) der ÜZCa nachweisen. In den von uns untersuchten ÜZCa war bei 71 % die Mutation zu finden, was in der beschriebenen Größenordnung der Arbeitsgruppe von Mochizuki und Kollegen liegt. Gewisse Abweichungen können z. B. durch genetische Unterschiede in den Hundepopulationen bedingt sein. Außerdem zeigten Mochizuki et al. (18), dass eine Droplet Digital PCR eine höhere Sensitivität (83 %) aufweist als die Sanger-Sequenzierung (75 %). Da in unserer Studie bei keinem Hund ohne ÜZCa die BRAF-Mutation vorlag, ist das positive Ergebnis offensichtlich als beweisend anzusehen (Spezifität 100 %). Allerdings muss beachtet werden, dass nur der positive Nachweis der BRAF-Mutation in den Tumorzellen Aussagekraft besitzt. Fehlt die BRAF-Mutation im eingesandten Material, ist der Tumor entweder nicht durch diese Mutation verursacht (ca. 30 %) oder es sind keine mutierten Zellen in der Probe vorhanden oder es liegt tatsächlich kein Übergangszellkarzinom vor. Auffällig war, dass nur bei einem der vier ÜZCa Grad III die BRAF-Mutation gefunden wurde. Dies stellt möglicherweise eine Tendenz dar, der an größeren Fallzahlen nachgegangen werden soll. Da auch Prostatakarzinome des Hundes die BRAF-Mutation aufweisen können (80 %), ist nicht ganz auszuschließen, dass bei (kastrierten) Rüden Tumorzellen aus dem Prostatakarzinom in den Urin gelangen und zu einem positiven Ergebnis führen (3).

Auch zytologisch und histologisch lassen sich Übergangszellkarzinome der Urethra nicht in allen Fällen sicher von einem Prostatakarzinom unterscheiden (11). Hier sind gegebenenfalls weiterführende klinische Verfahren für die korrekte pathoanatomische Zuordnung notwendig.

Ob und inwieweit diese BRAF-Mutationsanalyse zur Frühdiagnostik von Übergangszellkarzinomen im Sinne einer Liquid Biopsy (13) zum Einsatz kommen kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen (3). Hinsichtlich der prognostischen Relevanz der BRAF-Mutation in Verbindung mit der Graduierung der kaninen ÜZCa wird der klinische Verlauf noch aufgearbeitet (Manuskript in Vorbereitung).

Ein therapeutischer Ansatzpunkt für ÜZCa mit einer BRAF-Mutation könnte der Einsatz von Mitogen-activated-protein - (MAP)-Kinase-Inhibitoren sein, die bei Melanomen und einigen Karzinomen des Menschen bereits zur Anwendung kommen (19). Erste In-vitro-Untersuchungen an Zelllinien der kaninen Übergangszellkarzinome zeigten ein besseres Ansprechen auf den MAPKinase Inhibitor Vemurafenib (z. B. verminderte Proliferationsaktivität), wenn eine BRAF-Mutation vorlag, als wenn die Mutation nicht vorhanden war (3).

In den Fällen, bei denen eine sichere zytologische oder histologische Diagnose des Übergangszellkarzinoms möglich ist, könnte die genetische Untersuchung auf die BRAF-Mutation in Zukunft einerseits prognostisch relevant sein und andererseits als Kriterium für eine individualisierte Therapie herangezogen werden, falls entsprechende MAP-Kinase-Inhibitoren für den Hund Anwendung finden können.

3. Eigene Untersuchungen

Fazit für die Praxis

Die Untersuchung auf die BRAF-Mutation V595E ist eine neue Methode, die in ca. zwei Drittel der fraglichen Fälle helfen kann, die Verdachtsdiagnose eines Übergangszellkarzinoms abzusichern. Die Methode ist vor allem sinnvoll, wenn die zytologische oder histologische Untersuchung keine eindeutige Diagnose liefert oder nur Urin für die Untersuchung zur Verfügung steht. Als Einsendungsmaterial eignen sich zellreiches Urinsediment und/oder zellreiche zytologische Ausstriche (gefärbt oder ungefärbt, aber nicht mit einem Deckglas versehen) sowie formalinfixierte Biopate. Der Vorteil für die Praxis ist, dass zunächst Urinsediment untersucht werden kann, ohne dass ein invasives Verfahren wie eine Ansaug- oder Exzisionsbiopsie nötig ist. Eine Ultraschalluntersuchung oder eine Endoskopie ist aber sowohl bei einem positiven als auch bei einem negativen molekulargenetischen Ergebnis notwendig, um im positiven Fall die Neoplasie klinisch zu charakterisieren bzw. einen falsch negativen Befund auszuschließen und die Differenzialdiagnosen einzuzugrenzen.

Interessenkonflikt

Die Autorinnen Aupperle-Lellbach, Grassinger, Hohloch und Kehl arbeiten bei der Firma Laboklin, die die hier vorgestellte Untersuchung kommerziell anbietet.

Literatur

1. Borjesson DL, Christopher MM, Ling GV. Detection of canine transitional cell carcinoma using a bladder tumor antigen urine dipstick test. *Vet Clin Pathol* 1999;28: 33–38.
2. Childress MO, Adams LG, Ramos-Vara JA, Freeman LJ, He S, Constavle PD, Knapp DW. Results of biopsy via transurethral cystoscopy and cystostomy for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and urethra in dogs: 92 cases (2003–2008). *J Am Vet Med Assoc* 2011; 239: 350–356.
3. Decker B, Parker HG, Dhawan D, Kwon EM, Karlins E, Davis BW, Ramos-Vara JA, Bonney PL, McNeil EA, Knapp DW, Ostrander EA. Homologous mutation to human BRAF V600E is common in naturally occurring canine bladder cancer – Evidence for a relevant model system and urine-based diagnostic test. *Mol Cancer Res* 2015; 13: 993–1002.
4. Driesen A, Amort K, Kramer M. Röntgen des Abdomens beim Kleintier IV – Harntrakt. *Kleintierprax* 2014; 59, 529–538.
5. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Canc* 2003; 3:11–22.
6. Heilmann RM, McNeil EA, Grützner N, Lanerie DJ, Suchodolski JS, Steiner JM. Diagnostic performance of the urinary canine calgranulins in dogs with lower urinary or urogenital tract carcinoma. *BMC Vet Res* 2017; 13: 112–223.
7. Hofer-Intewoorn N. Tumoren des Urogenitaltraktes. *Prakt Tierarzt* 2013; 94: 14–25.
8. Karpenstein H, Klump S, Seyrek-Intas, Kramer M. Sonographie bei Erkrankungen des Harntraktes von Hund und Katze. *Tierärztl Prax* 2011; 4: 281–288.
9. Kent MS, Zwingenberger A, Westropp JL, Barrett LE, Durbin-Johnson BP, Ghosh P, Vinal RL. MicroRNA profiling of dogs with transitional cell carcinoma of the bladder using blood and urine samples. *BMC Vet Res* 2017; 13: 339–352.
10. Kühnel S, Wimmer N, Schütz E, Kessler M. Rasseprädispositionen für Tumorerkrankungen beim Hund. *Prakt Tierarzt* 2013; 94: 788–795.
11. LeRoy BE, Nadella MVP, Toribio RE, Leav I, Rosol TJ. Canine prostate carcinomas express markers of urothelial and prostatic differentiation. *Vet Pathol* 2004; 41: 131–140.
12. Maeda S, Tomiyasu H, Tsuboi M, Inoue A, Ishihara G, Uchikai T, Chambers JK, Uchida K, Yonezawa T, Matsuki N. Comprehensive gene expression analysis of canine invasive urothelial bladder carcinoma by RNA-Seq. *BMC Cancer* (2018) 18: 472.
13. Meo AD, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer* 2017; 16: 80–94.
14. Meuten DJ, Meuten TLK. Tumours of the urinary system. In: *Tumors in Domestic Animals*, 5th edn. DJ Meuten, ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell 2017; 632–688.

3. Eigene Untersuchungen

15. Mochizuki H, Breen M. Comparative aspects of BRAF Mutations in canine cancers. *Vet Sci* 2015; 2: 231–245.
16. Mochizuki H, Breen M. Sequence analysis of RAS and RAF mutation hot spots in canine carcinoma. *Vet Comp Oncol* 2016; 15: 1598–1605.
17. Mochizuki H, Kennedy K, Shapiro SG, Breen M. BRAF Mutations in canine cancers. *PLoS ONE* 2015; 10 (6): e0129534.
18. Mochizuki H, Shapiro SG, Breen M. Detection of BRAF mutation in urine DNA as a molecular diagnostic for canine urothelial and prostatic carcinoma. *PLoS ONE* 2015; 10 (12): e0144170.
19. Montor WR, Salas AROSE, Machado de Melo FH. Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. *Mol Cancer* 2018; 17: 55–73.
20. Pantke P. Diagnostik und Therapie des Übergangszellkarzinoms des unteren Harntraktes beim Hund. *Kleintierprax* 2018; 63: 76–92.
21. Patrick DJ, Fitzgerald SD, Sesterhenn IA, Davis CJ, Kiupel M. Classification of canine urinary bladder urothelial tumours based on the World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification. *J Comp Pathol* 2006; 135: 190–199.
22. Sotirakopoulos AJ, Armstrong PJ, Heath L, Madrill NJ, McNiel EA. Evaluation of microsatellite instability in urine for the diagnosis of transitional cell carcinoma of the lower urinary tract in dogs. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 1445–1451.
23. Vap LM, Shropshire SB. Urine cytology: collection, film preparation, and evaluation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2017; 47 (1): 135–149.

3.2.2. Studie 2: Correlation of BRAF Variant V595E, Breed, Histological Grade and Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Transitional Cell Carcinomas. GRASSINGER JM, MERZ S, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, KLOPFLEISCH R. *Vet Sci*. 2019 Mar; 19;6(1). pii: E31. doi: 10.3390/vetsci6010031.

<https://doi.org/10.3390/vetsci6010031>



Article

Correlation of BRAF Variant V595E, Breed, Histological Grade and Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Transitional Cell Carcinomas

Julia M. Grassinger^{1,*}, Sophie Merz², Heike Aupperle-Lellbach¹, Hanna Erhard¹  and Robert Klopfleisch²

¹ Laboklin GmbH & Co. KG, 97688 Bad Kissingen, Germany; aupperle@laboklin.com (H.A.-L.); h.erhard@laboklin.com (H.E.)

² Institute of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany; Sophie.Merz@fu-berlin.de (S.M.); Robert.Klopfleisch@fu-berlin.de (R.K.)

* Correspondence: grassinger@laboklin.com

Received: 20 December 2018; Accepted: 13 March 2019; Published: 19 March 2019



Abstract: The presence of BRAF variant V595E, as well as an increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in canine transitional cell carcinoma (TCC) are well-described in the literature. The aim of the present study was to investigate the correlation between breed (terrier versus non-terrier dogs), histological grade, COX-2 expression, and BRAF mutation in canine TCC. Therefore, transmurular TCC biopsies from 65 dogs (15 terriers, 50 non-terriers) were graded histologically into low- and high-grade. Immunohistochemical evaluation of the intensity of COX-2 expression was performed using an immunoreactive score (IRS). Exon 15 of chromosome 16 was examined for the BRAF variant c.1799T>A by TaqMan[®] SNP assay. TCC was low-grade in 20 cases (one terrier, 19 non-terriers) and high-grade in 45 cases (14 terriers, 31 non-terriers). Contrary to humans, histological grade was not significantly correlated to the intensity of COX-2 expression. BRAF mutation was detected in 11/15 (73%) TCC of terriers and in 18/50 (36%) TCC of non-terriers. Histological grade and BRAF mutation were not correlated significantly ($p = 0.2912$). Terriers had a considerably higher prevalence of high-grade tumors ($p < 0.0001$), as well as of BRAF mutation ($p \leq 0.05$) compared to non-terriers. In non-terriers, neoplasms with BRAF mutation showed a significantly higher intensity of COX-2 expression than those without BRAF mutation ($p \leq 0.05$). In conclusion, in contrast to humans, testing for BRAF mutation in canine TCC is a sensitive diagnostic method especially in terriers (73%) and may be recommended as a screening test. However, evidence of BRAF mutation in canine TCC is not a predictor for the histological grade. Moreover, a positive correlation between histological grade and the intensity of COX-2 expression was not found. Further studies are necessary to clarify the clinical and prognostic relevance of the elevated intensity of COX-2 expression of TCC with BRAF mutation detected in non-terriers.

Keywords: dog; terrier; urothelial carcinoma; histological grading; BRAF mutation; COX-2

1. Introduction

Transitional cell carcinoma (TCC), also referred to as urothelial carcinoma, is the most common malignant tumor of the canine urinary tract. The breed-associated risk includes a 21-fold increased risk in Scottish terriers and a 3.0–6.5-fold increased risk in Eskimo dogs, Shetland sheepdogs, West Highland white terriers, keeshonds, samoyeds, and beagles compared to mixed breed dogs [1]. The mean age of dogs at time of diagnosis is 11 years [2]. Several studies have confirmed the increased risk of bladder cancer in female dogs and in neutered ones compared to intact dogs of the same gender [3]. Interestingly, in dogs with high breed-associated risk, the sex predilection is

less pronounced [4]. High-grade TCC is reported in more than 90% of dogs suffering from TCC [2]. Metastasis at the time of diagnosis is described in 37% of dogs [5]. In dogs suffering from TCC that only undergo surgical therapy, a longer mean survival time has rarely been observed, in contrast to dogs with TCC that have been treated with additional therapies [6]. Thus, other treatments are recommended, such as radiotherapy, transurethral diode laser resection, intravesical interleukin-2 injection, classic chemotherapy, or metronomic chemotherapy with continuous oral administration of chlorambucil [6]. Knapp et al. reported that the nonselective cyclooxygenase (COX) inhibitor piroxicam significantly enhanced the activity of vinblastine, a chemotherapeutic agent, in dogs with TCC [7]. However, the complex mechanisms of the effect of COX inhibitors are still poorly understood [8]. Mohammed et al. [9] reported a reduction in tumor volume in 12 of 18 dogs due to induction of apoptosis caused by piroxicam. COX enzymes catalyze the rate-limiting step of prostaglandin biosynthesis and are involved in inhibiting apoptosis, promoting cell proliferation, stimulating angiogenesis, and decreasing immunity [10]. In general, COX-1 is present in several normal tissues, and COX-2 is expressed in multiple neoplasms and inflammatory cells [11]. Regular expression of COX-1 has been described in normal urinary bladder epithelium, but intense COX-2 expression was found in canine TCC [12]. There are different examination methods to evaluate COX-2 expression: Khan et al. estimated the percentage of COX-2 positive neoplastic cells and their staining intensity, but did not use a scoring system [12]. Lee et al. reported increased COX-2 expression in 57.7% of canine TCC based only on the percentage of positive neoplastic cells, but not including the various expression intensities within one TCC [13]. Knottenbelt et al. reported positive COX-2 expression in up to 100% of the canine TCC examined considering the different expression intensities and percentages of positive cells within one TCC, but without calculating any scores nor describing whether neoplastic and/or inflammatory cells were taken into account [8]. Mutsaers et al. [14] did not believe the intensity of COX-2 expression was a useful predictive factor for a response to piroxicam. In his study, he included the percentage of neoplastic cells with COX-2 immunoreactivity, as well as the different staining intensities, but did not work with any scoring system. Furthermore, he only evaluated the area of the highest COX-2 staining (“hot spot”) without considering areas with lower COX-2 expression. This may have caused an overestimation of the COX-2 expression in the investigated TCC and could be the reason for the low response to piroxicam that was observed, even though COX-2 expression was high. *In vitro*, the selective COX-2 inhibitor mavacoxib exerts antitumor effects independent of COX-2 expression levels in canine, as well as in human cell lines [15]. However, *in vivo* studies addressing this finding are not available so far. The different studies regarding the intensity of COX-2 expression are therefore not comparable and should be interpreted carefully.

In humans, 2% of all cancers are TCC [2]. The mean age at time of diagnosis is 65 years [2], and a gender predisposition is described for men [16]. The majority of bladder cancers in humans are classified as superficial low-grade TCC [3]. However, in invasive high-grade TCC, metastasis is reported in 5–20% of cases at the time of diagnosis [16]. The COX-2 expression in humans is a marker of invasion, recurrence, and a short survival time [17–19]. It is particularly expressed in high-grade forms, possibly playing a role in the differentiation of this tumor and being a valuable target molecule in the treatment of TCC [20]. In the standard treatment of human TCC, transurethral resection is performed first [21]. Post-transurethral resection, intravesical therapy with bacillus Calmette-Guérin, an attenuated mycobacterium with antitumor activity when administered as an intravesical instillation [22], has been shown to reduce the risk of recurrence. Alternative chemotherapy agents, such as mitomycin C, doxorubicin, epirubicin, gemcitabine, and thiotepa, can be used for intravesical instillation [23]. For patients with inoperable, locally-advanced metastatic TCC, systemic chemotherapy is the standard initial treatment [24]. In the second-line setting, immunotherapy with immune check point inhibitors is now the standard of care [24].

Mutations of BRAF genes (B-isoform of rapidly accelerated fibrosarcoma) are a common cause of tumor formation in humans and lead to abnormal proliferation and differentiation of cells [25]. Studies from the U.S. have shown that BRAF variant V595E (cBRAF reference sequence ENSCAFT0000006306),

which corresponds to the BRAF (V600E) variant in humans, can be found in tumor cells of 65–85% of dogs with TCC [26–29]. In humans, as well as in dogs, BRAF mutation is a thymine-to-adenine transversion in exon 15 of chromosome 16, resulting in the amino acid substitution from valine to glutamic acid [30]. This somatic mutation was specifically found in canine TCC and prostate tumors, but rarely in other canine tumors [31]. A breed predisposition showing a BRAF mutation in cases of TCC was found for terrier breeds [6]. In humans, only 1% of TCC is caused by BRAF mutation [32], and this mutation appeared to be infrequent in TCC [31]. However, BRAF mutation plays a crucial role in human cancer, and about 7% of all cancer cases carry this mutation [33]. It is frequently mutated in melanomas (50%) [34], papillary thyroid cancers (45%) [35], colon cancers (10%) [36], and in non-small-cell lung cancers (10%) [37]. A positive correlation of COX-2 expression and the presence of BRAF mutation were reported in human colorectal cancer [38], but have not been investigated in dogs. Therapeutic concepts against human tumors induced by BRAF mutation include MAP kinase inhibitors, which are used in human medicine [39]. Bourn and Cekanova reported a potentiated MAP kinase inhibitor therapy *in vitro* in combination with COX inhibitors in human, as well as in canine TCC cell lines [40]. However, MAP kinase inhibitors are not currently available for dogs.

Positive correlations between histological grade and COX-2 expression, as well as between COX-2 expression and the presence of BRAF mutation were presumed for canine TCC. Therefore, the aims of this study were to determine any correlation between histological grade and intensity of COX-2 expression, between the histological grade and the presence of BRAF mutation, as well as between the presence of BRAF mutation and the intensity of COX-2 expression in canine TCC. Furthermore, the differences in histological grade, intensity of COX-2 expression, and BRAF mutation between terriers and non-terrier breeds were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

TCC biopsy samples from 65 dogs submitted for routine diagnostics were selected over a seven-year period (2012–2018) (Tables 1 and 2). Inclusion criteria were: transmurals biopsy (comprising mucosa, submucosa, and muscularis) and full information about breed, sex, and age of the dogs. The animals were between 6 and 14 years old (median 11 years). The cohort included 23 intact and 22 spayed females, as well as 12 intact and 8 castrated male dogs. Included were 15 terrier breeds according to the Fédération Cynologique Internationale (FCI) Group 3 (Section 1, large- and medium-sized Terriers: 1 Airedale terrier, 1 Fox terrier; Section 2, small-sized terriers: 5 Scottish terriers, 4 Jack Russel terriers, 3 West Highland white terriers; Section 4, toy tTerriers: 1 Yorkshire terrier) and 50 dogs of non-terrier breeds (21 mongrels, 4 beagles, 3 Shetland sheepdogs, 3 poodles, 3 Bernese mountain dogs, and 16 other breeds).

Table 1. Terriers: signalment, histological grade, cyclooxygenase-2 expression, and BRAF mutation in transitional cell carcinoma ($n = 15$).

Breed	Mean Age (Years)	Sex	Histological Grade	Median COX-2 IRS	BRAF Mutation
Scottish terrier ($n = 5$)	10 ± 2	3 F, 1 FN, 1 M	5 high	4.5 (range: 0.8–7.6)	4+ 1–
Jack Russel terrier ($n = 4$)	12 ± 1	3 F, 1 FN	4 high	4.8 (range: 4.5–5.1)	3+ 1–
West Highland white terrier ($n = 2$)	11 ± 2	1 FN, 1 M	1 high 1 low	5.8 (range: 4.8–6.7)	1+ 1–

3. Eigene Untersuchungen

Table 1. *Cont.*

Breed	Mean Age (Years)	Sex	Histological Grade	Median COX-2 IRS	BRAF Mutation
Airedale terrier (<i>n</i> = 1)	10	FN	high	4.1	+
Fox terrier (<i>n</i> = 1)	12	FN	high	3.8	+
Welsh terrier (<i>n</i> = 1)	12	FN	high	4.7	–
Yorkshire terrier (<i>n</i> = 1)	11	F	high	7.1	+

+ = BRAF mutation positive, – = BRAF mutation negative, COX = cyclooxygenase, F = female, FN = neutered female, IRS = immunoreactive score, M = male, MN = neutered male.

Table 2. Non-terrier breeds: signalment, histological grade, cyclooxygenase-2 expression, and BRAF mutation in transitional cell carcinoma (*n* = 50).

Breed	Mean Age (Years)	Sex	Histological Grade	Median COX-2 IRS	BRAF Mutation
Mongrel (<i>n</i> = 21)	11 ± 2	7 F, 6 FN, 4 M, 4MN	13 high 8 low	4.0 (range: 1.4–8.1)	9+ 12–
Beagle (<i>n</i> = 4)	10 ± 2	1 F, 3 FN	3 high 1 low	1.9 (range: 1.3–7.9)	3+ 1–
Bernese mountain dog (<i>n</i> = 3)	9 ± 2	1 FN, 2 M	2 high 1 low	5.2 (range: 0.5–6.9)	1+ 2–
Cocker spaniel (<i>n</i> = 3)	10 ± 3	1 F, 1 FN, 1 MN	2 high 1 low	0.7 (range: 0.4–1.2)	3–
Poodle (<i>n</i> = 3)	11 ± 1	1 F, 1 FN, 1 M	2 high 1 low	3.3 (range: 3.0–7.8)	2+ 1–
Shetland sheepdog (<i>n</i> = 3)	10 ± 2	3 F	1 high 2 low	1.9 (range: 0.3–2.3)	1+ 2–
Australianshepherd (<i>n</i> = 2)	10 ± 1	1 F, 1 FN	1 high 1 low	4.4 (range: 3.8–5.0)	2–
Small Münsterländer (<i>n</i> = 1)	11	F	low	5.0	–
Rottweiler (<i>n</i> = 1)	10	M	low	1.0	–
Podenco (<i>n</i> = 1)	11	MN	low	7.8	+
Siberian husky (<i>n</i> = 1)	12	MN	low	1.1	+
German wirehaired pointer (<i>n</i> = 1)	8	F	high	0.8	–
Great dane (<i>n</i> = 1)	7	M	high	0.9	–
Bracke (<i>n</i> = 1)	11	FN	high	0.2	–
French bulldog (<i>n</i> = 1)	10	F	high	4.1	–

Table 2. Cont.

Breed	Mean Age (Years)	Sex	Histological Grade	Median COX-2 IRS	BRAF Mutation
Basset (n = 1)	12	FN	high	9.8	–
Bichon frise (n = 1)	11	MN	high	0.3	–
Border collie (n = 1)	12	M	high	2.0	–

+ = BRAF mutation positive, – = BRAF mutation negative, COX = cyclooxygenase, F = female, FN = neutered female, IRS = immunoreactive score, M = male, MN = neutered male.

2.2. Histology

The formalin-fixed tissue specimens (min: $0.5 \times 0.4 \times 0.4$ mm, max: $6.5 \times 4.4 \times 1.5$ mm) were dehydrated through a graded series of ethanols (up to 96% ethanol) and embedded in paraplast (SAV-liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Germany; PFNP-20-5858-1). Slices ($3\text{--}4 \mu\text{m}$) were mounted on coated slides (SuperFrost® Plus, Menzel Gläser, Thermo Scientific, Waltham, MA USA). The standard hemalaun-eosin stain (HE) was performed [41]. Transitional cell carcinomas were diagnosed routinely and graded according to Meuten and Meuten [42] into low- or high-grade. Mitotic figures were counted in 10 high-power fields (HPFs; $400\times$; area: $68,700 \mu\text{m}^2$, Nikon Eclipse E200 microscope; Nikon, Tokyo, Japan) in areas with the highest mitotic activity, and the mean value was calculated.

Low-grade TCC was characterized by mild to moderate cellular atypia, mild nuclear abnormalities, rare to no mitoses, mild to no invasion of the submucosa with intact basement membrane, or no invasion into blood and lymphatic vessels.

In contrast, epithelial tumor cells of high-grade TCC showed loss of cell polarity, disorganized growth, marked cellular atypia, marked nuclear pleomorphism, or numerous mitoses. They penetrated the basement membrane and invaded deeper structures. Furthermore, they attached to and invaded blood or lymphatic vessels. In general, one characteristic feature of high-grade TCC is sufficient to define it as high-grade, but mostly numerous signs of malignancy coexist in canine TCC. The growth pattern was classified as papillary (projecting into the lumen) or non-papillary (sessile or flat) [42].

2.3. Immunohistochemistry

Tissue sections were mounted on SuperFrost slides. Pre-treatment at a high temperature ($96 \text{ }^\circ\text{C}$) with EDTA buffer (pH 9.0) was performed for 30 min. Cross-reacting monoclonal mouse anti-human COX-2 (1:100, clone cx-294, Dako, # 3617) diluted in antibody diluent (Zytomed, # ZUC025-100) served as the primary antibody. Canine TCC specimens were used as positive control tissues. Subsequently, sections were incubated overnight at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ with the primary antibodies or a non-related isotype-matched antibody (negative control) [43]. As detection system, Dako EnVision+System-HRP (diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)) (Dako, # K4006), was applied for 30 min at room temperature. All slides were finally developed in DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako, # K4006) for 10 min at room temperature and counterstained with hemalum.

Neoplastic and inflammatory cells were histologically identified. COX-2 expression was partly seen in the inflammatory and neoplastic cells, but not in the normal bladder epithelium. For this study, however, only neoplastic cells were further examined. In each specimen, the intensity of COX-2 expression of the neoplastic cells showed a great range, in some cases reaching from mild to marked in one sample. Thus, a modified version of the immunoreactive score (IRS) published by Hoffmann et al. [44] was used. For this, the percentages of positive neoplastic cells (PP) at the different staining intensities (SI) were assessed in the whole slide. The different staining intensities were scored with values ranging from 0–10 with the staining intensity being defined as: 0 = absence of staining,

0.5 = slight, 1 = mild, 5 = moderate, and 10 = most intense staining. The IRS was calculated as a sum of the PP multiplied with their respective SI scores, multiplied by the factor 1/100.

$$IRS = \frac{1}{100} \sum_{n=1}^5 \{PPn \times SI_n\} \quad (1)$$

n = index, PP = percentage of positive cells, SI = staining intensity.

The TCC were graded based on the COX-2 expression intensity (IRS) into minimal (IRS \leq 0.9), mild (IRS $>$ 0.9 to \leq 3.3), moderate (IRS $>$ 3.3 to \leq 6.3), and marked (IRS $>$ 6.3).

2.4. BRAF Mutation Analysis

DNA isolation from paraffin-embedded tissue was performed using a QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany; # 56404). This kit uses a column-based method designed for purifying DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. To do so, paraffin was dissolved in xylene. The sample was lysed under denaturing conditions with a short proteinase K digestion. After that, incubation at 90 °C reversed formalin cross-linking. DNA bound to the membrane of the column in a reaction tube, while contaminants flowed through. DNA was eluted and used for the subsequent PCR reaction. Exon 15 was examined for the presence of the mutation (BRAF variant c.1799T>A) by the TaqMan[®] SNP assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, # 4332075) using FastStart Essential DNA Probes Master and LightCycler 480 II (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). The genotyping assay was performed using specific, provided PCR primers (forward primer TGGGACCCACTCCATCGA, reverse primer CATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGAT, no canine-specific primers) and probes (the probe sequence for detection of the wild-type allele was TAGCCACAGTGAAATC labelled with VIC[™] fluorescent dye, the probe sequence for detection of the mutant allele was CCACAGAGAAATC with FAM[™] fluorescent dye). Cycling conditions were 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C.

2.5. Statistical Analyses

Statistical significance analyses were performed using GraphPad Prism Version 7.03 for Windows, GraphPad Software (La Jolla, CA, USA) www.graphpad.com. Data concerning correlations between breeds, histological grade, and BRAF mutation (nominal data) were tested using Fisher's exact test. Ordinal data (IRS for COX-2 expression) were examined for the Gaussian distribution using the Shapiro-Wilk normality test. Non-parametric data (IRS for COX-2 expression) were verified using the Mann-Whitney U test. Values \leq 0.05 were considered as significant.

3. Results

3.1. Histology

Histological grading resulted in 20 (1/15 terriers, 19/50 non-terriers) low- and 45 (14/15 terriers, 31/50 non-terriers) high-grade TCC. Dogs with low-grade TCC (Figure 1a) were between seven and 14 years (median 11 years) old. The growth pattern was papillary in 13 and non-papillary in seven cases. A mild invasion of the submucosa without destruction of the basement membrane was seen in 11/20 and no invasion of the submucosa in 9/20 cases. Anisocytosis and anisokaryosis were mild, and few mitoses/HPF were counted. Vascular attachment was found in 6/20 cases, but vascular invasion was not seen in any of the samples.

Dogs with high-grade TCC (Figure 1b) were also, on average, 11 years old (range: 6–13 years). The growth pattern was non-papillary in 25 cases and papillary in 20 cases. The neoplasms massively invaded either the submucosa (6/45) or submucosa and muscularis (39/45). Anisocytosis and anisokaryosis were moderate to marked, and several mitoses/HPF were counted. Vascular attachment (35/45) and vascular invasion (23/45) were identified in many cases.

An age- or sex-related difference between low- and high-grade TCC was not detectable. In terriers ($p < 0.0001$), as well as in non-terriers ($p \leq 0.05$), high-grade TCC was significantly more prevalent than low-grade TCC (Figure 2). Furthermore, high-grade TCC was considerably more often found in terriers than in non-terriers ($p \leq 0.05$).

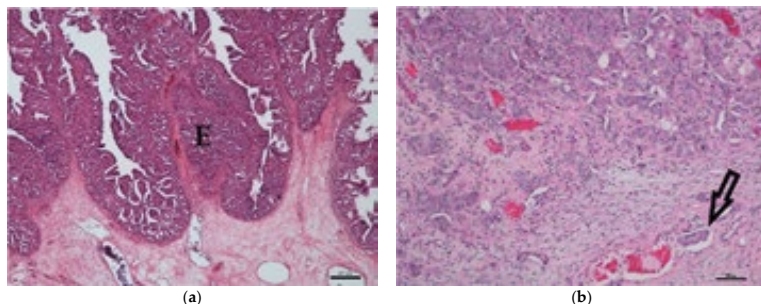


Figure 1. Histology of canine transitional cell carcinoma specimens. (a) Low-grade transitional cell carcinoma of an 11-year-old male mongrel. The epithelium (E) is markedly thickened and multi-layered, and the irregularly-arranged cells show mild anisocytosis and anisokaryosis. The basement membrane is intact (HE, bar = 250 μm). (b) High-grade transitional cell carcinoma of an eight-year-old castrated male mongrel with marked anisocytosis and anisokaryosis. The tumor intensively invades the submucosa, and additionally, an intravascular tumor cell embolus (arrow) is detectable (HE, bar = 100 μm).

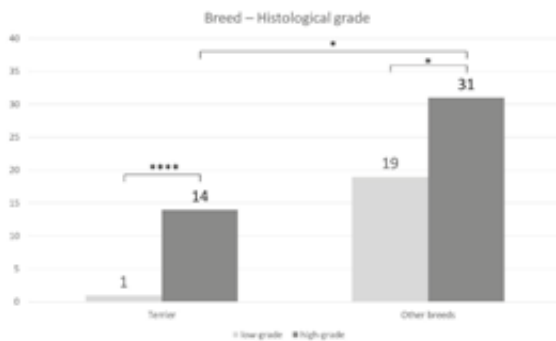


Figure 2. Correlation between histological grade and breed: A significantly higher percentage of high-grade transitional cell carcinoma (TCC) compared to low-grade TCC was observed in terriers (**** $p < 0.0001$) and in non-terriers (* $p \leq 0.05$). Furthermore, a considerably higher percentage of high-grade transitional cell carcinoma was observed in terriers compared to non-terriers (* $p \leq 0.05$) (Fisher's exact test).

3.2. COX-2 Immunohistochemistry

Normal transitional cell epithelium was not labelled by anti-COX-2 antibody (Figure 3a). Inflammatory cells and neoplastic cells were positive. The intensity of COX-2 expression of the neoplastic cells varied strongly within each specimen (Figure 3b). Calculation of the COX-2 expression intensity (IRS) resulted in TCC being labelled as follows: nine minimal (IRS 0.2–0.9) (Figure 3c), 20 mild (IRS 1.0–3.3) (Figure 3d), 24 moderate (IRS 3.6–6.3) (Figure 3e), and 13 marked (IRS 6.6–9.8) (Figure 3f). COX-2 IRS was statistically not normally distributed. There was no age- or sex-related difference in

COX-2 expression detectable. No significant ($p = 0.9859$) difference was found between COX-2 IRS of high-grade TCC (median 3.8, range: 0.2–9.8) and low-grade TCC (median 3.8, range: 0.3–7.8).

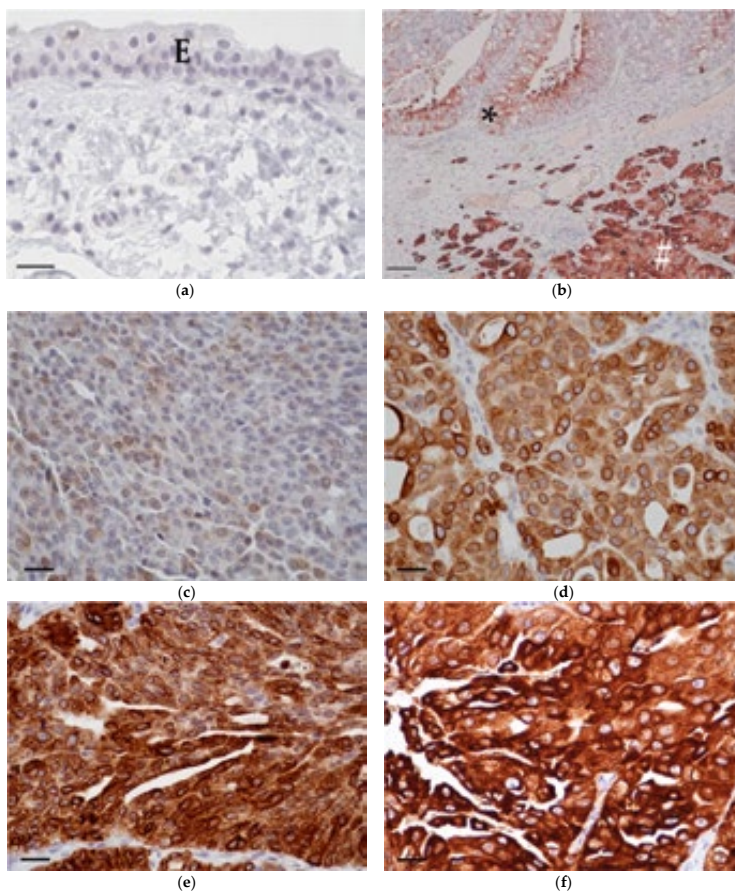


Figure 3. Cyclooxygenase-2 immunohistochemistry. (a) Normal bladder epithelium (E) of a 10-year-old female mongrel. There is no apparent cyclooxygenase-2 expression (COX-2, bar = 25 μ m). (b) High-grade transitional cell carcinoma from an 11-year-old female Scottish terrier with an IRS of 7.6. Intensity of cyclooxygenase-2 expression varied from mild (*) to marked (#) within the specimen (COX-2, bar = 100 μ m). (c) Area with minimal intensity of cyclooxygenase-2 expression in high-grade transitional cell carcinoma from an 11-year-old castrated female bracke (COX-2, bar = 25 μ m). (d) Area with mild intensity of cyclooxygenase-2 expression in low-grade transitional cell carcinoma from a 12-year-old castrated female beagle (COX-2, bar = 25 μ m). (e) Area with moderate intensity of cyclooxygenase-2 expression in high-grade transitional cell carcinoma from a 13-year-old castrated male mongrel (COX-2, bar = 25 μ m). (f) Area with marked intensity of cyclooxygenase-2 expression in low-grade transitional cell carcinoma from an 11-year-old castrated male podenco (COX-2, bar = 25 μ m).

3.3. BRAF Mutation

Genetic testing of 65 TCC showed BRAF mutation in 29 cases (11/15 terriers, 18/50 non-terriers) and the wild-type in 36 dogs (4/15 terriers, 32/50 non-terriers) (Figure 4). There was no significant ($p = 0.2912$) difference in the prevalence of BRAF mutation between low- and high-grade TCC. BRAF mutation was significantly ($p \leq 0.05$) more often found in TCC of Terriers than in TCC of non-terrier breeds (Figure 5). In terriers, COX-2 expression intensity did not show a significant difference ($p = 0.3915$) between neoplasms with or without BRAF mutation. In contrast, in non-terrier breeds, TCC with BRAF mutation had a significantly ($p \leq 0.05$) higher COX-2 expression than TCC without BRAF mutation. TCC without BRAF mutation had a higher COX-2 expression in terriers than TCC without BRAF mutation had in non-terriers, but this difference was not significant ($p = 0.4154$). There was also no significant ($p = 0.0579$) difference in the intensity of COX-2 expression between BRAF mutation-positive TCC in terriers and BRAF mutation-positive TCC in non-terriers (Figure 6).

In conclusion, this interpretation algorithm (Figure 7) can be derived from the data of transmural biopsies in our study: In cases of TCC with BRAF mutation in terriers, a high-grade tumor with increased COX-2 expression is most likely. Cases of TCC without BRAF mutation are rare in the analyzed terrier breeds. Irrespective of the BRAF mutation status, in the case of TCC in a non-terrier, high-grade TCC, is more likely than low-grade TCC, just as it is in terriers. However, since terriers suffer significantly more often from high-grade TCC than non-terriers, it cannot be assumed that the high-grade morphology in non-terrier TCC is the most likely. Therefore, the histological grade of TCC in non-terriers should always be verified in addition by histological examination. As in terriers, an increased COX-2 expression in TCC in non-terriers is only likely if a positive BRAF mutation is detected.

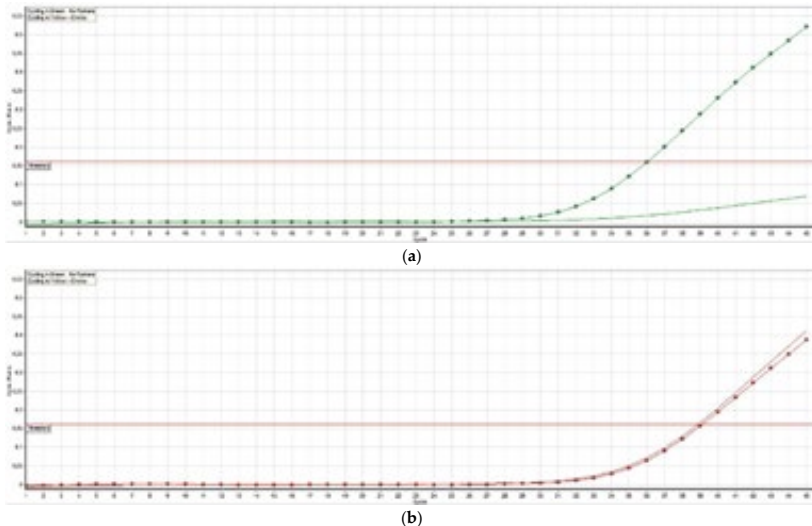


Figure 4. Fluorescent signals detected by the TaqMan[®] SNP assay of a canine transitional cell carcinoma. (a) In transitional cell carcinoma without BRAF mutation, there is only a signal from the wild-type probe (homozygous thymine, dotted curve) and no signal from the variant probe (curve without dots). (b) In transitional cell carcinoma with BRAF mutation (heterozygous thymine and adenine), signal curves of both the wild-type probe (thymine, dotted curve) and the variant (adenine, curve without dots) can be seen.



Figure 5. Correlation between breed and the presence or absence of BRAF mutation: BRAF mutation occurs significantly more often in transitional cell carcinoma in terriers than in transitional cell carcinoma in non-terriers (Fisher’s exact test, $p \leq 0.05$).

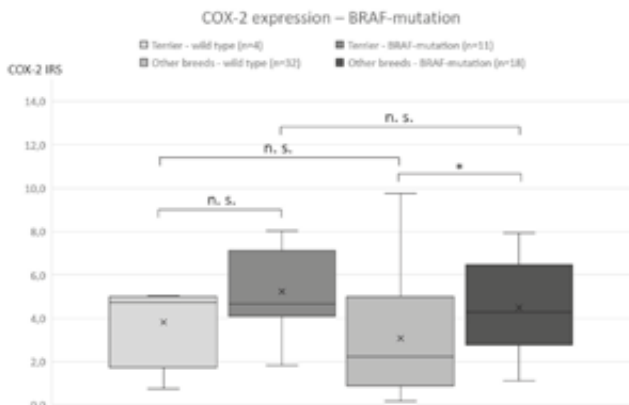


Figure 6. Correlation between the intensity of cyclooxygenase-2 expression and the presence or absence of BRAF mutation: a significant difference in the cyclooxygenase-2 expression was only detected in non-terrier breeds comparing BRAF mutation-positive and -negative transitional cell carcinoma (Mann–Whitney U -test, $p \leq 0.05$).

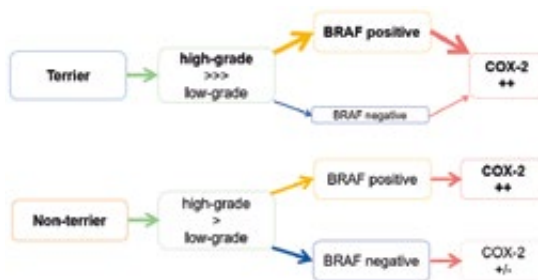


Figure 7. Interpretation algorithm for BRAF mutation in terriers and non-terrier breeds in correlation with the histological grade and cyclooxygenase-2 expression.

4. Discussion

To the authors' knowledge, this is the first study in dogs investigating the histological grade of TCC, the intensity of COX-2 expression, and the presence of the BRAF mutation with a special focus on breed predilection of terriers.

Although canine and human TCC are largely and histopathologically very similar [45], there are some remarkable differences regarding the sex predisposition, histological grade, and prevalence of BRAF mutation, as well as a notable correlation of histological grade and intensity of COX-2 expression. A known sex predisposition for female dogs suffering from TCC [3] was confirmed by the present study. In humans, a gender predisposition is described for men [16]. Furthermore, canine TCC shows mostly high-grade malignancy [2,42]. This was confirmed by the present data and is contrary to the situation in humans where the majority of TCC is classified as superficial low-grade [3]. Another difference between both species is the prevalence of BRAF mutation in TCC. While infrequently in human TCC (<1%) [31], BRAF mutation is often detected in canine TCC [26–29,39]. Additional BRAF mutations in exons 11 and 14 were reported in human cancers [46], but until now, not in dogs. In humans, a significantly higher intensity of COX-2 expression is known in high-grade TCC [17,19]. In the present study, we found no considerable difference in the intensity of COX-2 expression between low- and high-grade canine TCC. However, a significant positive correlation was found between the presence of BRAF mutation and the intensity of COX-2 expression in TCC in non-terrier breeds. This finding is consistent with the results of a study in humans describing higher COX-2 expression in BRAF mutation-positive colorectal cancer than in BRAF mutation-negative intestinal tissue [38]. The authors of that study suggested that the correlation between BRAF mutation and COX-2 is mediated by insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) as shown in human pancreatic carcinomas, where IGF-1R is enhanced by the BRAF mutation and mediates COX-2 expression selectively via the MAPK/(Erk-1/2) pathway [47]. Whether this mechanism is also present in canine TCC requires verification. It is possible that the correlation of BRAF mutation and the intensity of COX-2 expression in terrier breeds would have reached significance if more cases had been included in this group. Because of the high heterogeneity of the studies addressing COX-2 expression intensity, which has already been discussed, it seems difficult to compare the various results. It is therefore still questionable if COX-2 expression is a predictive factor for the response of TCC to COX-2 inhibitors [48]. Additional research, including the development of *in vitro* cell systems, is needed to determine if COX-2 expression can be used as a reliable prognostic factor and as a definite therapeutic target in animal cancers [48]. Overall, the use of COX-2 inhibitors in the treatment of canine, as well as of human TCC is common, and the efficiency has been proven in numerous studies [40,49–51].

Terriers have a well-documented breed predisposition for TCC [1]. It has to be taken into consideration that histological grading of urinary bladder biopsies requires transmural samples of sufficient size to evaluate intramural and intravascular invasion [42]. In endoscopy, sampling of

biopsies with sufficient size is sometimes not possible. The present study shows that high-grade TCC is significantly more common in terriers than in non-terrier breeds. It can be concluded from these findings that high-grade TCC can be assumed as statistically most likely in terriers, even if histological grading may not be possible if the size of the specimen is too small.

Our results confirm the results by Pantke et al. who reported a significantly higher prevalence of BRAF mutation in TCC in terriers compared to TCC in non-terrier breeds [6]. This may be the reason for the high breed-associated risk regarding TCC in terriers [1] and may result from a specific genetic polymorphism in this breed. Such polymorphisms are responsible for the gender predisposition regarding BRAF mutation of melanomas in humans [52]. Whether such polymorphisms exist in dogs and if they make the BRAF gene susceptible to mutagenic factors could be the subject of further studies. However, Aupperle-Lellbach et al. (18 terriers and 48 non-terrier breeds) and Decker et al. (18 terriers, 38 non-terrier breeds, and 8 non-specified breeds) did not identify a breed disposition for BRAF mutation [26,27]. In another study by Maeda et al., only one terrier suffering from TCC was included [53], and two further studies by Mochizuki et al. did not mention the breeds that were included [28,29].

The lower percentage of TCC with BRAF mutation (48%) found in the present study compared to previous studies [26–29,53] may result from the lower number of included terriers in the study cohort. Moreover, it must be considered that the genetic pool for certain breeds in the U.S. does not necessarily parallel the genetic pool in Europe, and so, comparison of studies from the U.S. and Europe may be difficult.

Due to the high specificity (100%) of BRAF mutation in canine TCC [26], analysis is recommended in all breeds in the case of questionable, non-diagnostic cytological or histological samples. This avoids further (necessary) invasive sampling. Due to the high sensitivity of BRAF mutation for terriers in our study (73%) and the breed predisposition of terriers to suffer from TCC, testing for the presence of BRAF mutation in this breed is recommended as an additional screening test independent of age [54]. Urine can be used for this purpose. It must be considered that only a positive result is diagnostic for the presence of TCC. If BRAF mutation cannot be detected, the tumor is either not caused by this mutation, no mutated cells are present in the specimen, or there is no TCC. Nevertheless, testing for the presence of BRAF mutation can be used as a first, non-invasive test for the diagnosis of canine TCC.

5. Conclusions

Despite some similarities, there are also marked differences between canine and human TCC. Testing for BRAF mutation in canine TCC is a sensitive diagnostic method especially in terriers (73%) and recommended as a screening test. However, contrary to humans, the detection of BRAF mutation in canine TCC is not a predictor for the histological grade, and a positive correlation between histological grade and intensity of COX-2 expression was not found. The clinical and prognostic relevance of the increased intensity of COX-2 expression in TCC with BRAF mutation in non-terrier breeds has to be clarified in further studies.

Author Contributions: Conceptualization, H.A.-L.; methodology, J.M.G. and H.E.; formal analysis, S.M.; investigation, J.M.G.; writing, original draft preparation, J.M.G.; writing, review and editing, H.A.-L. and R.K.; visualization, J.M.G. All authors have reviewed the article and approved it for final submission.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We thank Rachel Marschang and Doreen Girndt for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Fulkerson, C.M.; Knapp, D.W. Management of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: A review. *Vet. J.* **2015**, *205*, 217–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Mutsaers, A.J.; Widmer, W.R.; Deborah, W.; Knapp, D.W. Canine Transitional Cell Carcinoma. *J. Vet. Intern Med.* **2003**, *17*, 136–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Knapp, D.W.; Glickman, N.W.; DeNicola, D.B.; Bonney, P.L.; Lin, T.L.; Glickman, L.T. Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urol. Oncol.* **2000**, *5*, 47–59. [[CrossRef](#)]
4. Knapp, D.W.; Ramos-Vara, J.A.; Moore, G.E.; Dhawan, D.; Bonney, P.L.; Young, K.E. Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development. *Ilar J.* **2014**, *55*, 100–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Norris, A.M.; Laing, E.J.; Valli, V.E.; Withrow, S.J.; Macy, D.W.; Ogilvie, G.K.; Tomlinson, J.; McCaw, D.; Pidgeon, G.; Jacobs, R.M. Canine bladder and urethral tumors: A retrospective study of 115 cases (1980–1985). *J. Vet. Intern Med.* **1992**, *6*, 145–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pantke, P. Diagnosis and treatment of transitional cell carcinoma of the lower urinary tract in the dog. *Kleintierprax* **2018**, *63*, 76–92.
7. Knapp, D.W.; Ruple-Czerniak, A.; Ramos-Vara, J.A.; Naughton, J.F.; Fulkerson, C.M.; Honkisz, S.I. A nonselective cyclooxygenase inhibitor enhances the activity of vinblastine in a naturally-occurring canine model of invasive urothelial carcinoma. *Bladder Cancer* **2016**, *2*, 241–250. [[CrossRef](#)]
8. Knottenbelt, C.; Mellor, D.; Nixon, C.; Thompson, H.; Argyle, D.J. Cohort study of COX-1 and COX-2 expression in canine rectal and bladder tumours. *J. Small Anim. Pract.* **2006**, *47*, 196–200. [[CrossRef](#)]
9. Mohammed, S.I.; Bennett, P.F.; Craig, B.A.; Glickman, N.W.; Mutsaers, A.J.; Snyder, P.W.; Widmer, W.R.; DeGortari, A.E.; Bonney, P.L.; Knapp, D.W. Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 56–58.
10. Carvalho, S.; Stoll, A.L.; Priestnall, S.L.; Suarez-Bonnet, A.; Rassnick, K.; Lynch, S.; Schoepper, I.; Romanelli, G.; Buracco, P.; Atherton, M.; et al. Retrospective evaluation of COX-2 expression, histological and clinical factors as prognostic indicators in dogs with renal cell carcinomas undergoing nephrectomy. *Vet. Comp. Oncol.* **2017**, *15*, 1280–1294. [[CrossRef](#)]
11. Mohammed, S.I.; Khan, K.N.; Sellers, R.S.; Hayek, M.G.; DeNicola, D.B.; Wu, L.; Bonney, P.L.; Knapp, D.W. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2004**, *70*, 479–483. [[CrossRef](#)]
12. Khan, K.N.; Knapp, D.W.; Denicola, D.B.; Harris, R.K. Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **2000**, *61*, 478–481. [[CrossRef](#)]
13. Lee, J.Y.; Tanabe, S.; Shimohira, H.; Kobayashi, Y.; Oomachi, T.; Azuma, S.; Ogihara, K.; Inokuma, H. Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. *Res. Vet. Sci.* **2007**, *83*, 210–216. [[CrossRef](#)]
14. Mutsaers, A.J.; Mohammed, S.I.; DeNicola, D.B.; Snyder, P.W.; Glickman, N.W.; Bennett, P.F.; de Gortari, A.E.; Bonney, P.L.; Knapp, D.W. Pretreatment tumor prostaglandin E2 concentration and cyclooxygenase-2 expression are not associated with the response of canine naturally occurring invasive urinary bladder cancer to cyclooxygenase inhibitor therapy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2005**, *72*, 181–186. [[CrossRef](#)]
15. Hurst, E.A.; Pang, L.Y.; Argyle, D.J. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor mavacoxib (Trococxil™) exerts anti-tumour effects in-vitro independent of cyclooxygenase-2 expression levels. *Vet. Comp. Oncol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
16. Herr, H.W.; Shipley, W.U.; Bajorin, D.F. Cancer of the bladder. In *DeVita VT*, 6th ed.; Hellman, S., Rosenberg, S.A., Eds.; Principles and Practice of Oncology; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, PA, USA, 2001; pp. 139–141.
17. Shariat, S.F.; Matsumoto, K.; Kim, J.; Ayala, G.E.; Zhou, J.H.; Jian, W.; Benedict, W.F.; Lerner, S. Correlation of cyclooxygenase-2 expression with molecular markers, pathological features and clinical outcome of transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.* **2003**, *170*, 985–989. [[CrossRef](#)]
18. Agrawal, U.; Kumari, N.; Vasudeva, P.; Mohanty, N.K.; Saxena, S. Overexpression of COX2 indicates poor survival in urothelial bladder cancer. *Ann. Diagn. Pathol.* **2018**, *34*, 50–55. [[CrossRef](#)]
19. Kömhoff, M.; Guan, Y.; Shappell, H.W.; Davis, L.; Jack, G.; Shyr, Y.; Koch, M.O.; Shappell, S.B.; Breyer, M.D. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 29–35. [[CrossRef](#)]

20. Tabriz, H.M.; Olfati, G.; Ahmadi, S.A.; Yusefnia, S. Cyclooxygenase-2 expression in urinary bladder transitional cell carcinoma and its association with clinicopathological characteristics. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 4539–4543. [[CrossRef](#)]
21. Manoharan, M.; Soloway, M.S. Optimal management of the TIG3 bladder cancer. *Urol. Clin. N. Am.* **2005**, *32*, 133–145. [[CrossRef](#)]
22. Reisz, P.A.; Laviana, A.A.; Chang, S.S. Management of High-grade T1 Urothelial Carcinoma. *Curr. Urol. Rep.* **2018**, *19*, 103. [[CrossRef](#)]
23. Chou, R.; Buckley, D.; Fu, R.; Gore, J.L.; Gustafson, K.; Griffin, J.; Grusing, S.; Selph, S. *AHRQ comparative effectiveness reviews. Emerging Approaches Diagnose and Treatment Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer [Internet] 2015*; Report No.: 15(16)-EHC017-EF; Agency for Healthcare Research and Quality (US): Rockville, MD, USA, 2015.
24. Burkhari, N.; Al-Shamsi, H.O.; Azam, F. Update on the Treatment of Metastatic Urothelial Carcinoma. *Sci. World J.* **2018**, *2018*, 5682078.
25. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aupperle-Lellbach, H.; Grassinger, J.; Hohloch, C.; Kehl, A.; Pantke, P. Diagnostic value of the BRAF variant V595E in urine samples, smears and biopsies from canine transitional cell carcinoma. *Tierarztl. Prax. K.* **2018**, *46*, 289–295.
27. Decker, B.; Parker, H.G.; Dhawan, D.; Kwon, E.M.; Karlins, E.; Davis, B.W.; Ramos-Vara, J.A.; Bonney, P.L.; McNeil, E.A.; Knapp, D.W.; et al. Homologous mutation to human BRAF V600E is common in naturally occurring canine bladder cancer—Evidence for a relevant model system and urine-based diagnostic test. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 993–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Mochizuki, H.; Kennedy, K.; Shapiro, S.G.; Breen, M. BRAF Mutations in canine cancers. *PLoS ONE* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mochizuki, H.; Shapiro, S.G.; Breen, M. Detection of BRAF Mutation in urine DNA as a molecular diagnostic for canine urothelial and prostatic carcinoma. *PLoS ONE* **2015**. [[CrossRef](#)]
30. Dhillon, A.; Hagan, S.; Rath, O.; Kolch, W. Map kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 3279–3290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Mochizuki, H.; Breen, M. Comparative aspects of BRAF mutations in canine cancers. *Vet. Sci.* **2015**, *2*, 231–245. [[CrossRef](#)]
32. Boulalas, I.; Zaravinos, A.; Delakas, D.; Spandidos, D.A. Mutational analysis of the BRAF gene in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int. J. Biol. Markers* **2009**, *24*, 17–21. [[CrossRef](#)]
33. Marranci, A.; Jiang, Z.; Vitiello, M.; Guzzolino, E.; Comelli, L.; Sarti, S.; Lubrano, S.; Franchin, C.; Echevarria-Vargas, I.; Tuccoli, A.; et al. The landscape of BRAF transcript and protein variants in human cancer. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* **2015**, *161*, 1681–1696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kimura, E.T.; Nikiforova, M.N.; Zhu, Z.; Knauf, J.A.; Nikiforov, Y.E.; Fagin, J.A. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: Genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1454–1457. [[PubMed](#)]
36. Rajagopalan, H.; Bardelli, A.; Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.; Velculescu, V.E. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* **2002**, *418*, 934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **2014**, *511*, 543–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Jin, M.; Long, Z.W.; Yang, J.; Lin, X. Correlations of IGF-1R and COX-2 Expressions with Ras and BRAF genetic mutations, Clinicopathological Features and Prognosis of Colorectal Cancer Patients. *Pathol. Oncol. Res.* **2018**, *24*, 45–57. [[CrossRef](#)]
39. Mochizuki, H.; Breen, M. Sequence analysis of RAS and RAF mutation hot spots in canine carcinoma. *Vet. Comp. Oncol.* **2017**, *15*, 1598–1605. [[CrossRef](#)]
40. Bourn, J.; Cekanova, M. Cyclooxygenase inhibitors potentiate receptor tyrosine kinase therapies in bladder cancer cells in vitro. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *13*, 1727–1742. [[CrossRef](#)]
41. Fischer, A.H.; Jacobson, K.A.; Rose, J.; Zeller, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Csh Protoc.* **2008**. [[CrossRef](#)]

42. Meuten, D.J.; Meuten, T.L.K. Tumors of the Urinary System. In *Tumors of Domestic Animals*, 5th ed.; Meuten, D.J., Ed.; Wiley-Blackwell: Ames, IN, USA, 2017; Volume 1, pp. 632–688.
43. Ramos-Vara, J.A.; Miller, M.A. When tissue antigens and antibodies get along: Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—the red, brown, and blue technique. *Vet. Pathol.* **2013**, *51*, 42–87. [[CrossRef](#)]
44. Hoffmann, C.; Bazer, F.W.; Klug, J.; Aupperle, H.; Ellenberger, C.; Schoon, H.A. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology* **2009**, *71*, 264–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. De Brot, S.; Robinson, B.D.; Scase, T.; Grau-Roma, L.; Wilkinson, E.; Boorjian, S.A.; Gardner, D.; Mongan, N.P. The dog as an animal model for bladder and urethral urothelial carcinoma: Comparative epidemiology and histology. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 1641–1649. [[CrossRef](#)]
46. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Stoeltzing, O.; Liu, W.; Fan, F.; Wagner, C.; Stengel, K.; Somcio, R.J.; Reinmuth, N.; Parikh, A.A.; Hicklin, D.J.; Ellis, L.M. Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human pancreatic carcinoma cells by the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) system. *Cancer Lett.* **2007**, *258*, 291–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Doré, M. Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Vet. Pathol.* **2011**, *48*, 254–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Allstadt, S.D.; Rodriguez, C.O., Jr.; Boostrom, B.; Rebhun, R.B.; Skorupski, K.A. Randomized phase III trial of piroxicam in combination with mitoxantrone or carboplatin for first-line treatment of urogenital tract transitional cell carcinoma in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2015**, *29*, 261–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Knapp, D.W.; Richardson, R.C.; Chan, T.C.; Bottoms, G.D.; Widmer, W.R.; DeNicola, D.B.; Teclaw, R.; Bonney, P.L.; Kuczek, T. Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J. Vet. Intern. Med.* **1994**, *8*, 273–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Arantes-Rodrigues, R.; Pinto-Leite, R.; Ferreira, R.; Neuparth, M.J.; Pires, M.J.; Gaivão, I.; Palmeira, C.; Santos, L.; Colaço, A.; Oliveira, P. Meloxicam in the treatment of in vitro and in vivo models of urinary bladder cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2013**, *67*, 277–284. [[CrossRef](#)]
52. Meyer, P.; Sergi, C.; Garbe, C. Polymorphisms of the BRAF gene predispose males to malignant melanoma. *J. Carcinog.* **2003**, *2*, 7. [[CrossRef](#)]
53. Maeda, S.; Tomiyasu, H.; Tsuboi, M.; Inoue, A.; Ishihara, G.; Uchikai, T.; Chambers, J.K.; Uchida, K.; Yonezawa, T.; Matsuki, N. Comprehensive gene expression analysis of canine invasive urothelial bladder carcinoma by RNA-Seq. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 472. [[CrossRef](#)]
54. Breen, M.; Wiley, C. Flüssigbiopsie—Die Zukunft der Tumordiagnostik. *Vet. Focus* **2018**, *28*, 39–45.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.2.3. Studie 3: Nachweis der BRAF-Mutation bei kaninen Prostataerkrankungen.

GRASSINGER JM, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, MERZ S, KLOPFLEISCH R. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2019 Oct; 47(5):313-320. doi: 10.1055/a-0987-8212.

<https://doi.org/10.1055/a-0987-8212>

Nachweis der BRAF-Mutation bei kaninen Prostataerkrankungen

Detection of BRAF mutation in canine prostatic diseases

Julia M. Grassinger¹, Heike Aupperle-Lellbach¹, Hanna Erhard¹, Sophie Merz², Robert Klopfleisch²

¹LABOKLIN GmbH & Co. KG, Bad Kissingen; ²Institut für Tierpathologie, Freie Universität Berlin

Schlüsselwörter

BRAF-Variante V595E, Hund, Prostatakarzinom, Gleason-Score

Key words

BRAF variant V595E, dog, prostate carcinoma, Gleason score

ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand und Ziel In der Literatur konnte in 80 % der Biopate kaniner Prostatakarzinome (PCa) die BRAF-Mutation nachgewiesen werden. Ziele dieser Arbeit waren, kanine Prostataproben aus dem eigenen Tiergut hinsichtlich des Auftretens der BRAF-Mutation zu untersuchen sowie die Spezifität und Sensitivität des Tests zu evaluieren. Außerdem sollte die Methodik für zytologische Ausstriche etabliert und die Korrelation zwischen der BRAF-Mutation und dem histologischen Bild kaniner PCa dargestellt werden.

Material und Methoden Biopate (n = 70) und Feinnadelaspirate (n = 17) der Prostata von 87 Hunden wurden histologisch oder zytologisch untersucht. Die Einteilung der Erkrankungen erfolgte wie in der Literatur beschrieben in benigne Prostatahyperplasie (BPH, n = 22), Prostatitis (n = 14), Plattenepithelmetaplasie (PM, n = 2), Atrophie nach Kastration (n = 3) und PCa (n = 46; davon zytologisch nachgewiesen n = 11). Für die PCa wurde der Gleason-Score ermittelt. Zur DNA-Isolierung dienten kommerzielle Testkits. Das Exon 15 wurde mit dem TaqMan® SNP Assay untersucht. Die Spezifität und Sensitivität des Tests wurden berechnet.

Ergebnisse Ein Gleason-Score von 6 und 7 ergab sich in je einem Fall, von 8 bis 10 bei 33 der PCa. Aus allen Proben ließ sich ausreichend DNA isolieren. Die BRAF-Mutation war in 28/46 PCa nachweisbar (Sensitivität 61 %). Bei keinem Hund mit BPH, Prostatitis, PM oder Atrophie wurde die BRAF-Mutation festgestellt (Spezifität 100 %). Durch die BRAF-Mutation verursachte PCa wiesen einen signifikant (p = 0,002) höheren Gleason-Score auf als PCa ohne diese Mutation.

Schlussfolgerung und klinische Relevanz Die Untersuchung auf das Vorliegen der BRAF-Variante V595E ist ein hochspezifisches Verfahren, mit dem sich in histologisch und zytologisch fraglichen Fällen die Verdachtsdiagnose eines PCa absichern lässt. Durch die BRAF-Mutation verursachte PCa zeigen histologisch stärker ausgeprägte Malignitätskriterien als nicht durch diese Mutation bedingte. Die klinische, therapeutische und prognostische Relevanz dieser Befunde bedarf weiterer Studien.

ABSTRACT

Objective In the literature, the BRAF mutation is reported to have been identified in 80 % of the examined canine prostate carcinomas (PCa). The objectives of this study were to test for the BRAF mutation in canine PCa in our cohort of canine patients, to determine the specificity and sensitivity of the test for this mutation, as well as to identify the association between the presence of the BRAF mutation and the histologic picture of PCa. Moreover, the method was to be established in cytologic samples.

Material and methods Biopsy samples (n = 70) and cytologic slides (n = 17) of 87 dogs with prostatic diseases were selected. Prostatic diseases were classified according to the literature as benign prostate hyperplasia (BPH, n = 22), prostatitis (n = 14), squamous cell metaplasia of the prostate (PM, n = 2), atrophy following castration (n = 3) and PCa (n = 46; histologic diagnosis n = 35, cytologic diagnosis n = 11). Additionally, the Gleason score was determined for each PCa. DNA isolation was performed using commercially available kits. Exon 15 was examined using the TaqMan® SNP assay. The specificity and sensitivity of the test were calculated.

Results A Gleason score of 6 and 7 was shown in 1 PCa each, in 33 cases the score ranged between 8 and 10. Sufficient amount of good-quality DNA was isolated from all samples. 28/46 PCa were tested positive for the BRAF mutation (sensitivity 61 %). The BRAF mutation was not evident in any of the dogs with BPH, prostatitis, PM or atrophy (specificity 100 %). PCa positive for the BRAF mutation exhibited a significantly higher Gleason score (p = 0.002) in comparison to PCa without this mutation.

Conclusion and clinical relevance BRAF mutation analysis is a highly specific method and may aid in confirming the diagnosis of PCa in histologically and cytologically questionable cases. PCa positive for BRAF mutation exhibited more criteria of malignancy than PCa without this mutation. The clinical, therapeutic, and prognostic relevance of these findings needs to be evaluated by further studies.

Einleitung

Platteneithelmetaplasie und Atrophie der Prostata, benigne Prostatahyperplasie (BPH), Prostatitis und Prostatakarzinom (PCa) kommen sowohl beim Menschen als auch beim Hund vor [9][19][21] [27][29]. Ultraschografisch und makroskopisch ist die Unterscheidung eines Tumors von einer Prostatitis oft schwierig, da in beiden Fällen Gewebseinschmelzungen auftreten können (Abb. 1). Die Diagnose wird dabei ultraschografisch, zytologisch anhand von Ausstrichen von Feinnadelaspiraten oder histologisch an formalinfixierten Biopтата gestellt [12].

Für das kanine PCa ist eine Rasseprädisposition für Mischlingshunde, Dobermann, Scottish Terrier, Airedale Terrier, Beagle, Deutsch Kurzhaar und Bouvier de Flandres beschrieben [6][12][33]. Betroffen sind meist kastrierte Rüden in einem Alter von 10 Jahren [8][31][33]. Klinische Symptome können Dysurie, Dyschezie, Schmerzen im Lendenwirbelbereich sowie eine Hinterhandparese sein [21].

Die Prostata des Hundes besteht aus Drüsengewebe und kleinen Ausführungsgängen, die in das Übergangsepithel der Urethra übergehen [32] (Abb. 2). Die Neoplasien können somit entweder vom glandulären Teil oder vom duktalem/urethralem Übergangsepithel der Prostata ausgehen. Anhand kleiner Biopтата ist die zytologische oder histologische Differenzierung der Ursprungszellen jedoch meist schwierig bis unmöglich [20][24]. Literaturangaben zufolge zeichnen sich urethrale Prostatakarzinome histologisch vor allem durch das Fehlen glandulärer Charakteristika aus [16]. In der Humanmedizin basiert das histologische Grading der Prostatakarzinome auf dem Gleason-Score, der 1974 erstmals etabliert und seitdem mehrfach überarbeitet wurde [10], zuletzt im Jahr 2014 [14][15]. Auch in der Veterinärpathologie wurden verschiedene Wachstumsmuster beschrieben [16]. Palmieri und Grieco [28] entwickelten für das kanine PCa ein histologisches Gradingssystem, das auf dem humanmedizinischen Gleason-Score von 2005 [13] basiert.

3. Eigene Untersuchungen

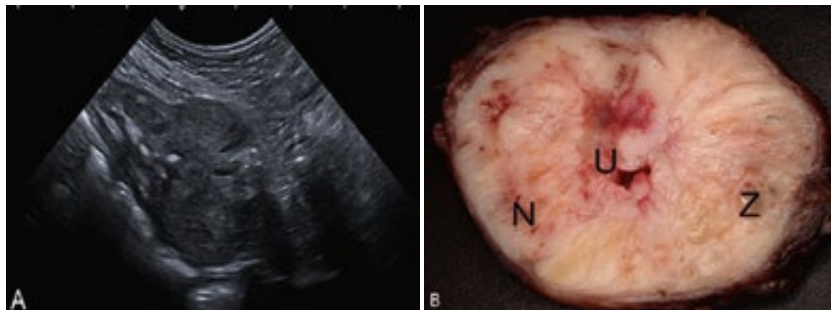


Abb. 1 Sonografische und makroskopische Befunde eines Prostatakarzinoms eines 8-jährigen Labrador-Mischlings.

a Sonografischer Längsschnitt durch die Prostata. Das Gewebe ist stellenweise sehr inhomogen und mit hypo- sowie hyperechogenen Arealen durchsetzt. Quelle: © Tierklinik Dresdner Heide.

b Querschnitt durch die Prostata mit diffusem Prostatakarzinom, das multiple Nekrosen (N), Blutungen und einzelne kleine Zysten (Z) aufweist. Zentral ist das Lumen der Urethra (U) zu erkennen.

Quelle: © H. Aupperle-Lellbach.

Fig. 1 Sonographic and gross pathologic findings of a prostate carcinoma of an 8-year old Labrador-mix.

a Longitudinal view of the prostate. The tissue is highly inhomogeneous with hypo- and hyperechogenic areas. Source: © Tierklinik Dresdner Heide.

b Gross pathologic cross section through the prostate with diffuse prostate carcinoma, which shows multiple necrotic (N) and hemorrhagic areas as well as isolated small cysts (Z). The lumen of the urethra (U) is depicted in the center. Source: © H. Aupperle-Lellbach.

Chromosomale Abnormalitäten (Polyploidie, gebrochene Chromosomenarme) wurden beim kaninen PCa von Winkler et al. [34] [35] und Madewell et al. [23] beschrieben, doch ist deren pathogenetische Relevanz noch unklar. Mutationen des BRAF-Gens (BRAF: B-Isoforme of Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) sind bekannte Faktoren in der Tumorpathogenese, die bei verschiedenen Spezies zur abnormalen Proliferation und Differenzierung von Zellen führen [11][24]. Forscher aus den USA untersuchten in Neoplasien des Hundes die BRAF-Variante V595E (cBRAF-Referenzsequenz ENSCAFT0000006306), die der humanen BRAF-Variante V600E entspricht, und identifizierten die Mutation in Tumorzellen von 80 % der 25 untersuchten kaninen PCa [25]. Im Gegensatz dazu wird das PCa des Menschen nur selten durch die BRAF-Mutation verursacht [17][22].

Während Mochizuki et al. [25] die Untersuchungen nur an paraffineingebetteten Biopaten von PCa durchführten, sollte in der vorliegenden Studie die Untersuchung auch an zytologischen Ausstrichen etabliert werden. Nach erfolgreicher Etablierung der Methodik zum Nachweis der BRAF-Mutation im Übergangszellkarzinom beim Hund [3] wurde mit der aktuellen Studie die Anwendung für die Diagnosestellung des kaninen PCa getestet. Dies ist von diagnostischer Relevanz, da in Urinproben oder urethral entnommenem zytologischem Probenmaterial grundsätzlich auch Zellen von PCa vorhanden sein können [24]. Des Weiteren sollten Prostataproben mit anderen diagnostizierten Erkrankungen untersucht werden, um eine Aussage hinsichtlich der Spezifität des Tests zu ermöglichen.

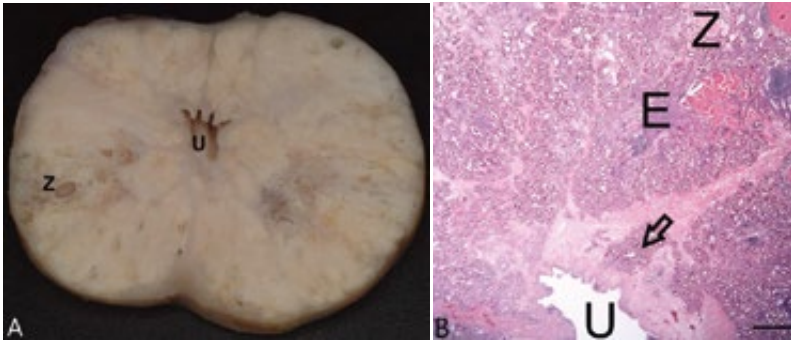


Abb. 2 Makroskopisches und histologisches Bild zum Aufbau der kaninen Prostata mit Darstellung von Veränderungen bei benigner Prostatahyperplasie.

a Querschnitt der hyperplastischen Prostata eines 10-jährigen Mischlings. Zentral ist das Lumen der Urethra (U) zu erkennen, im Drüsenparenchym finden sich multiple kleine Zysten (Z).

b Querschnitt der hyperplastischen Prostata eines 4-jährigen Welsh Corgi Pembroke. Das Drüsenparenchym weist multiple kleine Zysten (Z) und eine mittelgradige chronische nicht eitrig-interstitielle Entzündung (E) auf. Die Drüsenausführungsgänge (Pfeil) münden in die zentral gelegene Urethra (U).

(HE-Färbung, Messbalken = 1000 μ m). Quelle: © H. Aupperle-Lellbach.

Fig. 2 Gross pathological and histological photograph of the canine prostate showing the changes in benign prostatic hypertrophy.

a Cross section of a hyperplastic prostate of a 10-year old mix-breed dog. The urethral lumen (U) in the center is surrounded by parenchyma with multiple small cysts (Z).

b Cross section of a hyperplastic prostate of a 4-year old Welsh Corgi Pembroke. The glandular parenchyma exhibits multiple small cysts and a moderate chronic, non-purulent, interstitial inflammation (E). The excretory ducts (arrow) lead to the central urethra (U). (HE staining, bar = 1000 μ m). Source: © H. Aupperle-Lellbach

Material und Methoden

Probenmaterial

Das Probenmaterial umfasste 70 Biopate und 17 zytologische Ausstriche. Einschlusskriterien für die Studie waren, dass die Proben nach Informationen des Einsenders aus der Prostata stammten und Angaben zu Rasse und Alter der Rüden vorlagen. Im Rahmen der histologischen Routinediagnostik wurden 35 PCa, 17 BPH, 13 Prostatitiden, 2 Fälle mit Plattenepithelmetaplasie bei gleichzeitigem Sertoli-Zell-Tumor und 3 Fälle von Atrophie der Prostata nach Kastration festgestellt. Die Diagnosen der zytologischen Ausstriche waren PCa (n = 11), BPH (n = 5) und Prostatitis (n = 1). Die Diagnosen, die Rassenzugehörigkeit und das Alter der Hunde (1–18 Jahre, Median: 10 Jahre) sind in Tab. 1 aufgeführt.

3. Eigene Untersuchungen

Tab. 1 Signalement der Rüden mit verschiedenen Prostataerkrankungen, deren Proben auf das Vorliegen der BRAF-Mutation untersucht wurden.

Table 1 Breed and age of the dogs with different prostatic diseases, whose samples were examined for the presence of BRAF mutation.

Diagnose	Hunde	Medianes Alter (Min.–Max.)
	Rasse	
Karzinom (n = 35)	12 Mischlinge, 1 Rottweiler, 1 Samojeed, 2 Belgische Schäferhunde, 1 Katalanischer Schäferhund, 1 Golden Retriever, 1 Labrador, 1 Boxer, 1 Magyar Vizsla, 1 American Pit Bull Terrier, 1 American Staffordshire Terrier, 2 Jack Russell Terrier, 1 Irish Soft Coated Wheaten Terrier, 1 Jagdterrier, 1 Bracke, 3 Beagle, 1 Rauhaardackel, 1 Französische Bulldogge, 1 Pekinese, 1 Chihuahua	10 (6–18)
Karzinom zytologisch (n = 11)	4 Mischlinge, 1 Malinois, 1 Border Collie, 1 Kooikerhondje, 1 Französische Bulldogge, 1 Irish Soft Coated Wheaten Terrier, 1 Jack Russell Terrier, 1 Bichon Frisé	11 (7–13)
Prostatitis (n = 14)	5 Mischlinge, 1 Neufundländer, 3 Flat Coated Retriever, 1 Dalmatiner, 2 Französische Bulldoggen, 1 Beagle, 1 Chinesischer Schopfhund	10 (5–14)
BPH (n = 22)	3 Mischlinge, 1 Alaskan Malamute, 1 Husky, 1 Riesenschnauzer, 1 Labrador, 2 Deutscher Drahthaar, 1 Kleiner Münsterländer, 1 Gordon Setter, 1 Belgischer Schäferhund, 2 Border Collies, 1 Boxer, 1 American Staffordshire Terrier, 3 Cairn Terrier, 1 Shar-Pei, 1 Welsh Corgi Pembroke, 1 Französische Bulldogge	10 (1–14)
Atrophie (n = 3)	1 Hovawart, 1 Flat Coated Retriever, 1 Beagle	8 (6–8)
PM (n = 2)	1 Mischling, 1 Husky	11 (10–12)
BPH = benigne Prostatahyperplasie, Max = Maximum, Min = Minimum, PM = Plattenepithelmetaplasie		

Zytologische und histologische Untersuchung

Die ungefärbt eingesandten zytologischen Präparate wurden mittels Haema-Schnellfärbung (Labor, Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin LT 002–004) gefärbt. Die formalinfixierten Gewebeproben wurden routinemäßig in Paraffin eingebettet und mittels Hämatoxylin-Eosin gemäß Herstellerangaben gefärbt. Bei den Prostataerkrankungen erfolgte eine Einteilung nach den Angaben von Agnew und MacLachlan [2]. Die Prostatakarzinome wurden zusätzlich nach dem modifizierten Gleason-Score von Palmieri und Grieco [28] graduiert. Dazu wurden die in der Probe überwiegenden Wachstumsmuster (z. B. klein-azinär/duktal, papillär, cribriform mit und ohne zentrale Nekrosen [comedones], solide, Siegelring, muzinös) nach Palmieri et al. [29] klassifiziert, einem Zahlenwert von 1 bis 5 zugeordnet und daraus die Summe gebildet. Diese Summe stellt den Gleason-Score dar, der die Malignität des Tumors reflektiert (von 2 = niedrige maligne bis 10 = hochmaligne).

3. Eigene Untersuchungen

BRAF-Mutations-Analyse

Für die molekulargenetischen Analysen wurde von den Paraffinblöckchen der Biopate Material abgeholt und die DNA mittels QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Produkt-Nr. 56404; Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstelleranleitung isoliert. Die DNA aus dem Urinsediment und von den zytologischen Ausstrichen wurde jeweils mittels MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics, Mannheim) und MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Produkt-Nr. 06543588001, Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstelleranleitung isoliert. Das Exon 15 wurde mittels TaqMan® SNP Assay (ThermoFisher, Darmstadt) und FastStart Essential DNA Probes Master im LightCycler 480 II (Hoffmann-La Roche, Mannheim) auf das Vorliegen der BRAF-Mutation c.1784 T > A untersucht. Sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität des Tests auf das Vorliegen der BRAF-Mutation im kaninen Prostatakarzinom wurden berechnet.

Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen erfolgten mit der Software GraphPad Prism (.03) und IBM SPSS Statistics (Version 25). Nach Erstellung einer Kontingenztafel kam der Exakte Test nach Fisher zur Anwendung.

Ergebnisse

Histologische und zytologische Untersuchungen

Biopate In 10/17 Fällen mit BPH (Probengröße: Minimum 0,1 × 0,1 × 0,1 cm; Maximum 5,0 × 3,0 × 2,5 cm) dominierte histologisch ein tubulopapilliformes Wachstumsmuster, in 5/17 lagen zahlreiche Zysten vor (Abb. 2b). Eine geringgradige interstitielle nicht eitrig-Entzündung zeigten 3/17 BPH. Bei 13 Rüden dominierten entzündliche Veränderungen der Prostata (Probengröße: Minimum 0,1 × 0,2 × 0,3 cm; Maximum 4,8 × 3,0 × 2,5 cm). Diese waren entweder chronisch lymphoplasmazellulär mit Fibrosierung (n = 8) oder eitrig (n = 5). Eine zusätzliche milde Hyperplasie der Drüsen bestand bei 5/13 Hunden. Die Proben der beiden Rüden mit Sertoli-Zell-Tumor wiesen eine hochgradige Plattenepithelmetaplasie (Probengröße: Minimum 0,1 × 0,1 × 0,1 cm; Maximum 1,8 × 0,8 × 0,7 cm) des Drüsengewebes und eine Fibrosierung des Stromas auf. Bei 3 Hunden war die Prostata aufgrund einer unklaren Schmerzhaftigkeit in der Prostataregion biopsiert worden. Es zeigte sich eine hochgradige Atrophie der Drüsen (Probengröße: Minimum 1,2 × 0,2 × 0,2 cm; Maximum 2,4 × 1,0 × 0,8 cm) entsprechend dem Zustand nach Kastration. Hinweise auf eine Neoplasie oder Entzündung lagen nicht vor. Die dominierenden Wachstumsmuster der 35 PCa (Probengröße: Minimum 0,1 × 0,2 × 0,2 cm; Maximum 9,0 × 6,0 × 4,0 cm) waren solide (n = 18), cribriform (n = 6) oder cribriform mit zentraler Nekrose (n = 6) (übrige Muster s. Tab. 2, Abb. 3).

Tab. 2 Nachweis der BRAF-Mutation in Prostatakarzinomen (n = 35) in Abhängigkeit vom vorherrschenden histologischen Wachstumsmuster nach Palmieri und Grieco (28).

Table 2 Detection of BRAF mutation in prostate carcinomas (n = 35) depending on the predominant histological growth pattern according to Palmieri and Grieco (28).

	Klein azinär/duktal (Muster 3) (n = 3)	Papillär (Muster 4) (n = 2)	Cribriform (Muster 4) (n = 6)	Cribriform mit Nekrosen (Muster 5) (n = 6)	Solide (Muster 5) (n = 18)
BRAF-Wildtyp (n = 15)	3	2	4	1	5
BRAF-Mutation (n = 20)	0	0	2	5	13

3. Eigene Untersuchungen

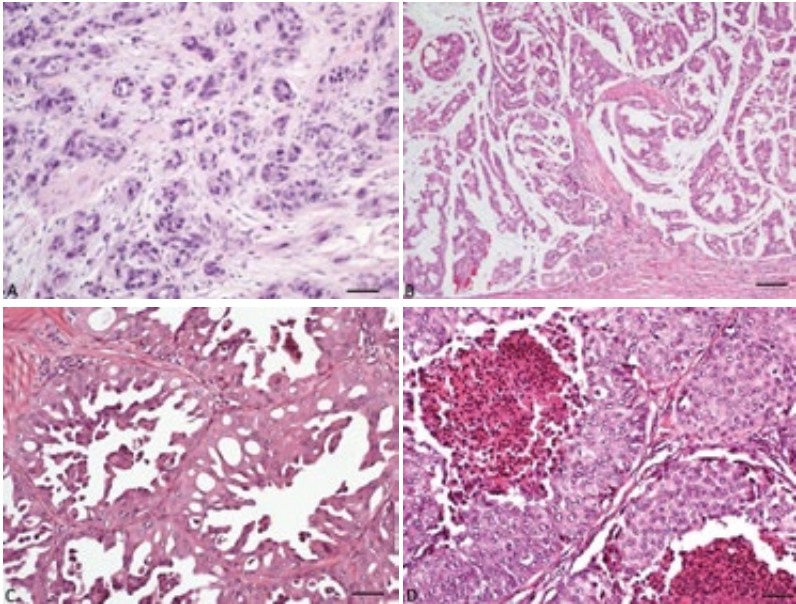


Abb. 3 Beispiele für verschiedene histologische Wachstumsmuster von kaninen Prostatakarzinomen, klassifiziert als Gleason-Muster nach Palmieri und Grieco [28].

a Klein-azinäres Wachstumsmuster (Gleason-Muster 3) bei einer 11-jährigen Französischen Bulldogge: Multiple kleine Drüsenanschnitte aus pleomorphen Epithelzellen mit Kernatypien und Mitosen infiltrieren ein fibröses Stroma (HE-Färbung, Messbalken = 50 μ m).

b Tubulopapilläres Wachstumsmuster (Gleason-Muster 4) bei einem 10-jährigen Jagdterrier: Dilatierte Drüsenanschnitte enthalten papilliforme Proliferationen von epithelialen Tumorzellen (HE-Färbung, Messbalken = 100 μ m).

c Cribriformes Wachstumsmuster bei einem 11-jährigen Labrador Retriever: Die Tumorzellen bilden Proliferationen in das präexistente Drüsenlumen und entwickeln dabei wiederum kleine tubuläre Formationen (Gleason-Muster 4) (HE-Färbung, Messbalken = 50 μ m).

d Cribriform wachsende Drüsenepithelien mit zentralen Nekrosen und Detritus („Komedonekrose“) (Gleason-Muster 5) bei einem 11-jährigen Mischling (HE-Färbung, Messbalken = 50 μ m). Quelle: © J. M. Grassinger.

Fig. 3 Examples of various histologic growth patterns of canine prostate carcinomas, classified as Gleason patterns according to Palmieri and Grieco [28].

a Small acinar growth pattern (Gleason pattern 3) in an 11-year old French Bulldog: Multiple small glands of pleomorphic epithelial cells with atypia of the nuclei and mitoses infiltrating the fibrous stroma (HE staining, bar = 50 μ m).

b Tubulopapillary growth pattern (Gleason pattern 4) in a 10-year old German Hunting Terrier: Dilated glands contain papilliform proliferations of epithelial tumor cells (HE staining, bar = 100 μ m).

c Cribriform growth pattern in a 11-year-old Labrador Retriever: The tumor cells develop proliferations in the pre-existing glands and build small tubular formations (Gleason pattern 4) (HE staining, bar = 50 μ m).

d Epithelium with cribriform growth pattern exhibiting areas of central necrosis and detritus („comedonecrosis“) (Gleason pattern 5) in a 11-year old mixed-breed dog (HE staining, bar = 50 μ m). Source: © J. M. Grassinger.

3. Eigene Untersuchungen

Tab. 3 Nachweis der BRAF-Mutation und modifizierter Gleason-Score (Palmieri und Grieco [28]) bei Prostatakarzinomen (n = 35).

Table 3 Detection of BRAF mutation and modified Gleason score (Palmieri und Grieco [28]) in prostate carcinomas (n = 35).

	Score 6 (n = 1)	Score 7 (n = 1)	Score 8 (n = 7)	Score 9 (n = 8)	Score 10 (n = 18)
BRAF-Wildtyp (n = 15)	1	1	6	1	6
BRAF-Mutation (n = 20)	0	0	1	7	12

Innerhalb der soliden PCa war in 10/18 Proben kein glanduläres Erscheinungsbild ersichtlich. Ein urethraler Ursprung ist in diesen 10 Fällen wahrscheinlich, konnte aber histologisch nicht 100 %ig bestätigt werden. Der Gleason-Score lag in den meisten Fällen zwischen 8 und 10 (Tab. 3). Von den 35 PCa zeigten 17 Proben 1 Wachstumsmuster, 13 Proben 2 Wachstumsmuster und 5 Proben 3 Wachstumsmuster (Tab. 4).

Tab. 4 Nachweis der BRAF-Mutation und Anzahl unterschiedlicher Wachstumsmuster nach Palmieri und Grieco (28) bei Prostatakarzinomen (n = 35).

Table 4 Detection of BRAF mutation and number of different growth pattern according to Palmieri und Grieco (28) in prostate carcinomas (n = 35).

	Anzahl der Wachstumsmuster		
	1	2	3
BRAF-Wildtyp (n = 15)	9	6	0
BRAF-Mutation (n = 20)	8	7	5

3. Eigene Untersuchungen

Zytologische Ausstriche

Alle 17 Ausstriche waren zellreich. Es wurden folgende Diagnosen gestellt: PCa (n = 11), BPH (n = 5) und eitrige Prostatitis (n = 1) (Abb. 4).

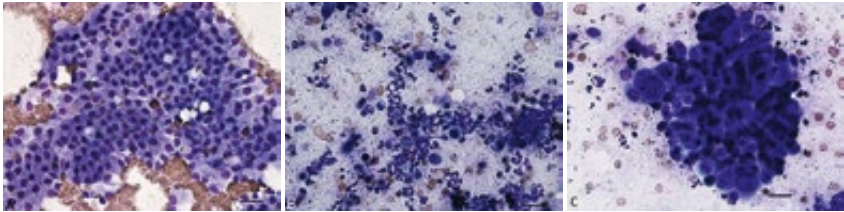


Abb. 4 Unterschiedliche zytologische Befunde in Präparaten von Feinnadelaspiraten.

a Benigne Prostatahyperplasie eines 9-jährigen Whippets: große Verbände epithelialer Zellen mit rundlichen Kernen und reichlich blassem Zytoplasma. Größe und Form von Kernen und Zellen variieren wenig. (Haema-Schnellfärbung, Messbalken = 25 µm).

b Eitrige Prostatitis eines 14-jährigen Beagles: Zwischen zahlreichen degenerierten neutrophilen Granulozyten finden sich nur wenige Prostataepithelzellen. (Haema-Schnellfärbung, Messbalken = 25 µm).

c Prostatakarzinom eines 13-jährigen Jack Russell Terriers: Verbände aus pleomorphen Epithelzellen mit großen, unterschiedlich geformten Kernen mit variierender Menge an Zytoplasma. (Haema-Schnellfärbung, Messbalken = 25 µm). Quelle: © J. M. Grassinger.

Fig. 4 Different cytologic findings in slides from fine-needle aspirations of the prostate.

a Benign prostatic hyperplasia in a 9-year old Whippet: large groups of epithelial cells with round nuclei and abundant pale cytoplasm. Size and shape of the nuclei and cells vary only slightly. (Diff-Quick, bar = 25 µm).

b Neutrophilic prostatitis in a 14-year old Beagle: Few prostatic epithelial cells are evident among numerous degenerated neutrophil granulocytes. (Diff-Quick staining, bar = 25 µm).

c Prostate carcinoma in a 13-year old Jack Russell Terrier: Groups of pleomorphic epithelial cells with large, differently shaped nuclei and varying amounts of cytoplasm. (Diff-Quick staining, bar = 25 µm). Source: © J. M. Grassinger.

Molekulargenetische Untersuchungen

Mit den eingesetzten Methoden ließ sich aus allen Proben eine ausreichende Menge qualitativ gut auswertbarer DNA isolieren. In keinem Fall mit BPH, Prostatitis, Plattenepithelmetaplasie oder Atrophie war die BRAF-Mutation feststellbar. Die BRAF-Mutation wurde bei 28/46 aller PCa (Ausstriche und Bioplate) nachgewiesen (zytologisch diagnostizierte PCa: 8/11, histologisch diagnostizierte PCa: 20/35). Damit lag die Spezifität des Tests auf das Vorliegen dieser Mutation im Prostatakarzinom des Hundes bei 100 %, die Sensitivität bei 61 %. In den schlecht differenzierten Karzinomen (solide, cribriform mit Nekrosen, 19/26 [73 %]) mit hohem Gleason-Score (9–10) war die BRAF-Mutation signifikant ($p = 0,002$) häufiger nachweisbar als in den mäßig differenzierten PCa (tubulär, papilliform oder cribriform ohne zentrale Nekrosen, 1/9 [11 %]) mit mittlerem Gleason-Score (6–8) (Tab. 2, Tab. 3).

Die durch die BRAF-Mutation bedingten PCa wiesen in 8/20 Fällen 1 Wachstumsmuster, in 7/20 Fällen 2 und in 5/20 Fällen 3 verschiedene Wachstumsmuster auf. Alle 8 durch die BRAF-Mutation bedingten PCa mit nur 1 Wachstumsmuster zeigten histologisch kein glanduläres Erscheinungsbild und sind möglicherweise urethralen Ursprungs. Im Gegensatz dazu wurden in 9/15 PCa ohne diese Mutation nur 1 Wachstumsmuster und in 6/15 PCa 2 verschiedene Wachstumsmuster detektiert (Tab. 4). Rassespezifische Unterschiede hinsichtlich Malignitätskriterien oder BRAF-Mutation waren zwischen Terriern (n = 8) und Nicht-Terriern (n = 38) nicht signifikant ($p = 0,6984$).

Diskussion

Anders als PCa des Menschen sind kanine PCa Literaturangaben [7] zufolge häufig hochmaligne. Dies konnte durch die vorliegende Studie bestätigt werden. Auch das in der Literatur beschriebene mediane Alter erkrankter Hunde von 10 Jahren [8][31][33] spiegelte sich in unserem Patientengut wider.

Histologisch zeigten die untersuchten PCa am häufigsten ein solides (möglicherweise urethrales) oder cribriformes Wachstumsmuster mit oder ohne zentrale Nekrose. Palmieri et al. [29] fanden in ihrem Untersuchungsgut hingegen überwiegend ein klein-azinär/ duktales oder solides Wachstumsmuster. Zum Großteil lagen pro Hund nur 1–2 eingesandte Biopate vor. Dies stellt einen erheblichen Unterschied zur Humanmedizin dar, wo 10–12 Biopate pro Probenentnahme Standard sind [30]. Dementsprechend steht in der Veterinärmedizin oft nur ein kleiner Teil des Tumors zur histologischen Untersuchung zur Verfügung. Dies limitiert die histologische Diagnose stark, da in nicht beprobten Anteilen der Neoplasie möglicherweise andere histologische Wachstumsmuster vorhanden sind [28].

Analog zu der Studie von Mochizuki et al. [25] war die BRAF-Variante V595E in Biopaten kaniner PCa im eigenen Tiergut nachweisbar. Auch für zytologische Ausstriche konnte die Methode in der vorliegenden Arbeit erfolgreich etabliert werden. Mochizuki et al. [25] fanden in 80 % der kaninen PCa die BRAF-Variante V595E, in der vorliegenden Studie war sie bei 61 % aller inkludierten PCa nachweisbar.

Durch die BRAF-Mutation verursachte PCa wiesen einen signifikant höheren Gleason-Score (mit schlecht differenziertem vorherrschendem Wachstumsmuster) und tendenziell mehrere verschiedene Wachstumsmuster auf als PCa ohne Nachweis dieser Mutation. Zudem wurde die BRAF-Mutation in soliden PCa, in denen keinerlei glanduläre Charakteristika ersichtlich waren, tendenziell häufiger (8/10) nachgewiesen als in PCa mit anderen Wachstumsmustern bzw. mit glandulären Charakteristika. Ob ein Zusammenhang mit dem eventuellen urethralen Ursprung dieser PCa besteht, muss in weiteren Studien und anhand immunhistochemischer Untersuchungen (Uroplakin III, Cytokeratin 7 [18]) geklärt werden.

Der Anteil schlecht differenzierter PCa mit solidem oder cribriformem (mit zentraler Nekrose) Wachstumsmuster im Untersuchungsgut beeinflusst höchstwahrscheinlich die Sensitivität des Tests auf das Vorliegen der BRAF-Mutation im kaninen PCa und könnte für die unterschiedlichen Sensitivitäten der beiden Studien verantwortlich sein. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die Vergleichbarkeit zwischen amerikanischen und europäischen Studien durch den unterschiedlichen genetischen Pool der beiden Hundepopulationen eingeschränkt sein kann.

Ein undifferenziertes Wachstumsmuster, das Vorliegen verschiedener Wachstumsmuster wie auch ein hoher Gleason-Score sprechen für den hochmalignen Charakter der kaninen PCa [29]. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass hochmaligne Formen des PCa des Hundes signifikant häufiger durch die BRAF-Mutation bedingt sind als mäßig maligne PCa. Dieser Zusammenhang sollte in weiteren Studien und anhand größerer Fallzahlen geprüft werden.

Da die BRAF-Variante V595E nur in PCa und weder in BPH noch in Prostataprobe mit Plattenepithelmetaplasie, Entzündung oder Atrophie nachweisbar war, stellt die Untersuchung auf das Vorliegen der BRAF-Mutation ein hochspezifisches Verfahren (100 %) zur Diagnose des kaninen PCa dar. Dadurch ist diese Methode vor allem in zytologisch oder histologisch fraglichen Fällen (z. B. aufgrund schlechter Probenqualität) und in Fällen mit überlappenden Bildern einer Prostatitis sowie einer Neoplasie empfehlenswert, um die Verdachtsdiagnose eines PCa abzusichern.

Anders als beim kaninen Übergangszellkarzinom der Harnblase [4] ist keine Rasseprädisposition für Terrier, ein PCa zu entwickeln, beschrieben. Dementsprechend war auch keine Prädisposition für diese Rasse hinsichtlich der BRAF-Mutation im kaninen PCa feststellbar.

Eine weitere Möglichkeit zum Einsatz des Verfahrens zum Nachweis der BRAF-Mutation in der Diagnostik des kaninen PCa könnte, ähnlich wie beim Übergangszellkarzinom der Harnblase, der Nachweis aus nicht invasiv gewonnenen Proben sein. Da PCa aber nur wenige Zellen in den Urin abschleifen [5], eignen sich dafür vermutlich besser durch Prostatalavage gewonnenes Material oder die aufgefangene Prostatafraktion des Ejakulats [1]. Eine ausreichende Menge von Tumorzellen ist dabei stets unabdingbar. Weitere Studien sind nötig, um genauere Aussagen

hinsichtlich der Sensitivität der Untersuchung auf das Vorliegen der BRAF-Mutation aus entsprechenden nicht invasiv gewonnenen Probenmaterialien treffen zu können.

Hinsichtlich der Therapie von durch die BRAF-Mutation verursachten kaninen PCa könnten MAP-Kinase-Inhibitoren (MAP = mitogen activated protein) eine neue Möglichkeit darstellen. Diese finden bereits in der Behandlung von Melanomen und einigen Karzinomen des Menschen Anwendung, die durch die identische Mutation verursacht werden [26]. Derzeit sind diese Arzneistoffe jedoch in der Tiermedizin nicht zugelassen.

FAZIT FÜR DIE PRAXIS

Die Untersuchung auf die BRAF-Variante V595E stellt eine neue, hochspezifische Methode dar, um die Verdachtsdiagnose eines Prostatakarzinoms abzusichern. Sie ist vor allem sinnvoll, wenn die zytologische oder histologische Untersuchung keine eindeutige Diagnose liefert, und kann so helfen, eine weitere invasive Probenentnahme zu vermeiden. Der Nachweis der BRAF-Mutation im Prostatakarzinom spricht für das Vorliegen einer hochmalignen, undifferenzierten Neoplasie, bei der das Risiko einer Metastasierung sehr hoch ist. Grundsätzlich gilt, dass immer nur der positive Befund beweisend für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms ist und ein negativer Befund selbiges nicht ausschließt.

Interessenkonflikt

Die Autorinnen Grassinger, Aupperle-Lellbach und Erhard arbeiten bei der Firma LABOKLIN GmbH & Co. KG, die die Untersuchung auf die BRAF-Variante V595E kommerziell anbietet.

Literatur

- [1] Adel A, Khadidja M. Canine prostatic disorders. *J Vet Med* 2017; 2 (3): 83–90
- [2] Agnew DW, MacLachlan NJ. Tumors of the genital system. In: DJ Meuten, ed. *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell; 2017: 632–688
- [3] Aupperle-Lellbach H, Grassinger J, Hohloch C et al. Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Biopsaten beim kaninen Übergangszellkarzinom. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2018; 46 (5): 289–295
- [4] Aupperle-Lellbach H, Kehl A, Merz S et al. Die BRAF-Mutation V595E im Übergangszellkarzinom – Untersuchungen zur Rassedisposition bei Terriern. *Kleintiermedizin* 2019; 1: 30–33
- [5] Barsanti JA, Finco DR. Evaluation of techniques for diagnosis of canine prostatic diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 185 (2): 198–200
- [6] Bryan JN, Keeler MR, Henry C] et al. A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer. *Prostate* 2007; 67 (11): 1174–1181
- [7] Christensen BW. Canine prostate disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2018; 48 (4): 701–719
- [8] Cornell KK, Bostwick DG, Cooley DM et al. Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. *Prostate* 2000; 45 (2): 173–183
- [9] Cunto M, Mariani E, Anicito Guido E et al. Clinical approach to prostatic diseases in the dog. *Reprod Domest Anim* 2019; doi:10.1111/rda.13437
- [10] Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR et al. Gleason grading: past, present and future. *Histopathology* 2012; 60 (1): 75–86
- [11] Downward J. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3 (1): 11–22
- [12] Eberhardt F, Kiefer I. Das Prostatakarzinom des Hundes. *Kleintier Konkret* 2015; 18 (4): 22–33
- [13] Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29 (9): 1228–1242
- [14] Epstein JI, Amin MB, Reuter VE et al. Contemporary Gleason grading of prostatic carcinoma: An update with discussion on practical issues to implement the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2017; 41 (4): e1–e7
- [15] Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee.

3. Eigene Untersuchungen

The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: Definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol* 2016; 40 (2): 244–252

[16] Kennedy PC, Cullen JM, Edwards JF et al. Tumors of accessory reproductive organs. In: PC Kennedy, JM Cullen, JF Edwards, MH Goldschmidt, Larssen S, Munson L, Nielsen S, eds. World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals, histological classification of tumors of the genital system. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1998: 20–22

[17] Köllermann J, Albrecht H, Schlomm T et al. Activating BRAF gene mutations are uncommon in hormone refractory prostate cancer in Caucasian patients. *Oncol Lett* 2010; 1 (4): 729–732

[18] Lai CL, van den Ham R, van Leenders G et al. Histopathological and immunohistochemical characterization of canine prostate cancer. *Prostate* 2008; 68 (5): 477–488

[19] Lee J. Transformation of adenocarcinoma of prostate to squamous cell carcinoma following hormonal treatment: A case report and review of the literature. *Radiol Case Rep* 2019; 14 (4): 483–489

[20] LeRoy BE, Nadella MV, Toribio RE et al. Canine prostate carcinomas express markers of urothelial and prostatic differentiation. *Vet Pathol* 2004; 41 (2): 131–140

[21] Leroy BE, Northrup N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Vet J* 2009; 180 (2): 149–162

[22] Liu T, Willmore-Payne C, Layfield LJ et al. Lack of BRAF activating mutations in prostate adenocarcinoma: a study of 93 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009; 17 (2): 121–125

[23] Madewell BR, Deitch AD, Higgins RJ et al. DNA flow cytometric study of the hyperplastic and neoplastic canine prostate. *Prostate* 1991; 18 (2): 173–179

[24] Mochizuki H, Breen M. Comparative aspects of BRAF mutations in canine Cancers. *Vet Sci* 2015; 2 (3): 231–245.

[25] Mochizuki H, Kennedy K, Shapiro SG et al. BRAF Mutations in canine cancers. *PLoS ONE* 2015. doi:10.1371/journal.pone.0129534

[26] Montor WR, Salas AROSE, Machado de Melo FH. Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. *Mol Cancer* 2018; 17 (1): 55–73

[27] Moreira DM, de O Freitas DM, Nickel JC et al. The combination of histological prostate atrophy and inflammation is associated with lower risk of prostate cancer in biopsy specimens. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2017; 20 (4): 413–417

[28] Palmieri C, Grieco V. Proposal of Gleason-like grading system of canine prostate carcinoma in veterinary pathology practice. *Res Vet Sci* 2015; 103: 11–15

[29] Palmieri C, Lean FZ, Akter SH et al. A retrospective analysis of 111 canine prostatic samples: histopathological findings and classification. *Res Vet Sci* 2014; 97 (3): 568–573

[30] Sato S, Watanabe M, Taniuchi S et al. Precise preoperative localization of prostate cancer employing 12-core needle biopsy with a tissue-marking method for effective surgical strategy. *Tohoku J Exp Med* 2015; 236 (1): 55–61

[31] Sorenmo KU, Goldschmidt M, Shofer F et al. Immunohistochemical characterization of canine prostatic carcinoma and correlation with castration status and castration time. *Vet Comp Oncol* 2003; 1 (1): 48–56

[32] Sun F, Báez-Díaz C, Sánchez-Margallo FM. Canine prostate models in preclinical studies of minimally invasive interventions: part I, canine prostate anatomy and prostate cancer models. *Transl Androl Urol* 2017; 6 (3): 538–546

[33] Teske E, Naan EC, van Dijk EM et al. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 197 (1–2): 251–255

[34] Winkler S, Murua Escobar H, Eberle N et al. Establishment of a cell line derived from a canine prostate carcinoma with a highly rearranged karyotype. *J Hered* 2005; 96 (7): 782–755

[35] Winkler S, Reimann-Berg N, Murua Escobar H et al. Polysomy 13 in a canine prostate carcinoma underlining its significance in the development of prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 169 (2): 154–158

4. Diskussion

Die vorliegenden drei Studien sind die ersten, die die Etablierung des Tests auf die BRAF-Mutation für zytologische Ausstriche von ÜZCa und PCa beinhalten und die Prävalenz, Spezifität sowie die Sensitivität des Test auf die BRAF-Variante V595E in diesen beiden Neoplasien der europäischen Hundepopulation erforschen. Zudem enthalten sie die ersten Untersuchungen zum Zusammenhang dieser Mutation mit dem histologischen Grading und im kaninen ÜZCa zusätzlich mit der immunhistologischen COX-2-Expression.

4.1. Untersuchungsgut, Auswertungsschemata, Limitationen

In die Studien 1 und 2 wurden insgesamt 101 Biopate und 48 Urinproben und/oder 31 zytologische Ausstriche von Hunden mit ÜZCa (n = 98; Studie 1: n = 33; Studie 2: n = 65), Zystitis (Studie 1: n = 23), Harnblasenpolypen (Studie 1: n = 7) oder ohne pathologische Veränderungen (Studie 1: n = 3) eingeschlossen. Im Rahmen von Studie 3 wurden 72 Biopsien und 17 zytologische Ausstriche der Prostata von Rüden mit PCa (histologisch: n = 35, zytologisch: n = 11), benigner Prostatahyperplasie (n = 22), Prostatitis (n = 14), Plattenepithelmetaplasie (n = 2) und Atrophie der Prostata (n = 25) untersucht. Alle Proben waren Routineeinsendungen an die Firma LABOKLIN GmbH & Co. KG und an das Institut für Tierpathologie der Universität Berlin und wurden im Zeitraum von 2012 bis 2019 zur Diagnostik eingesandt.

Einschlusskriterien für Studie 1 waren eine auswertbare Biopsie bzw. zellreiche zytologische Ausstriche oder Urinproben und das vollständige Signalement (Rasse, Geschlecht und Alter) der Hunde.

Für Studie 2 wurde neben einem vollständigen Signalement (Rasse, Geschlecht und Alter) das Einschlusskriterium einer transmuralen Biopsie, also die Mukosa, Submukosa und Muskularis umfassend, festgelegt, um ein Grading basierend auf dem muskelinvasiven Wachstum zu ermöglichen.

Einschlusskriterien für Studie 3 waren ebenfalls eine auswertbare Biopsie oder zellreiche zytologische Ausstriche, die laut Information des Einsenders aus der Prostata entnommen wurden, sowie die vollständigen Angaben hinsichtlich Rasse und Alter der Rüden.

Die Tiere des Untersuchungsgutes aus den Studien 1 und 2 waren im Median je 11 Jahre (Studie 1: 8 – 17 Jahre; Studie 2: 6 – 14 Jahre) alt. Der Anteil weiblicher Hunde überwog in beiden Studien (Studie 1: 64 %; Studie 2: 75 %). Damit entspricht das Untersuchungsgut beider Studien sowohl der in der Literatur beschriebenen Alters- als auch der

Geschlechtsverteilung für an einem ÜZCa erkrankten Hunden (KNAPP et al. 2000a). Die Rassedisposition von Terriern (FULKERSON und KNAPP 2015; PANTKE 2018) spiegelte sich ebenfalls im Patientengut beider Studien wider (Studie 1: 8/33; Studie 2: 15/65).

Die an einem PCa erkrankten Hunde der Studie 3 waren identisch zu den Angaben in der Literatur im Median 10 Jahre alt (6 – 18 Jahre). Bezüglich der Rassedisposition fanden sich analog zur Literatur auch in unserem Untersuchungsgut häufig Mischlinge (n = 16) und Beagle (n = 3) (CORNELL et al. 2000; TESKE et al. 2002; SORENMO et al. 2003; BRYAN et al. 2007; EBERHARDT und KIEFER 2015). Somit entspricht auch das Patientengut der Studie 3 weitgehend dem in der Literatur beschriebenen und eine Vergleichbarkeit des Patientengutes aller drei durchgeführten Studien mit der Literatur ist gegeben.

Hinsichtlich der histologischen Einteilungsschemata wurde in Studie 1 das Klassifizierungsschema nach PATRICK et al. (2006) und in Studie 2 das nach MEUTEN und MEUTEN (2017) angewandt. In beiden Schemata werden die untersuchten ÜZCa anhand ihrer Invasivität in low- und high-grade unterschieden. Basierend auf der Zellmorphologie und -architektur wird bei PATRICK et al. (2006) zusätzlich eine weitere Unterteilung der high-grade Tumoren in Grad II und III durchgeführt. Zu dieser weiterführenden Einteilung von high-grade ÜZCa gibt es zum jetzigen Zeitpunkt aber wenige Informationen hinsichtlich deren Praktikabilität und Sinnhaftigkeit (MEUTEN und MEUTEN 2017). Zudem hat sich in Studie 1 die Beurteilung der Invasivität der ÜZCa in die Blasenwand als reproduzierbarer und aussagekräftiger als die Beurteilung der Zellmorphologie und -architektur herausgestellt. Aus diesen Gründen wurde in Studie 2 das Einteilungsschema nach MEUTEN und MEUTEN (2017) gewählt.

Die molekulargenetische Untersuchung auf das Vorliegen der BRAF-Mutation wurde in Studie 1 mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Im Rahmen der Etablierung des genetischen Tests auf das Vorliegen der BRAF-Mutation als kommerzieller Test der Firma LABOKLIN GmbH & Co. KG wurde im Laufe der Studiendurchführung die Methode von der Sanger-Sequenzierung auf den TaqMan® SNAP Assay umgestellt. Obwohl hausinterne Studien eine sehr gute Vergleichbarkeit zeigten, stellt dies möglicherweise dennoch eine Limitation hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Studien dar. Zudem stand die, laut MOCHIZUKI et al. (2015b), sensitivste Methode für die Untersuchung auf das Vorliegen der BRAF-Mutation, die droplet digital PCR (ddPCR), zum Zeitpunkt der Studiendurchführung noch nicht zur Verfügung. In der Zwischenzeit konnten wir die ddPCR als routinemäßiges Testverfahren für den Nachweis der BRAF-Mutation bei LABOKLIN GmbH & Co. KG etablieren und können so auch eine quantitative Aussage hinsichtlich des Gesamtzellgehaltes, der Anzahl BRAF-positiver Zellen im Urin und so der Repräsentativität der Probe machen.

Eine Limitation aller drei Studien stellt die Anzahl der Proben pro Fall dar. Bei allen histologisch untersuchten ÜZCa- und PCa-Biopsien wurden nur ein bis maximal drei Lokalisationen beprobt. Im Gegensatz dazu werden in der Humanmedizin im Rahmen einer Prostatabiopsie in der Regel 12 unterschiedliche Areale beprobt (SATO et al. 2015). Aus diesem Grund kann sowohl bei den in Studie 1 untersuchten ÜZCa eine höhere Invasivität als auch in den PCa der Studie 3 ein anderes histologisches Wachstumsmuster in nicht beprobten Arealen des Tumors nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Da die Studie von PANTKE et al. (2019) gezeigt hat, dass die Überlebenszeiten von Hunden mit BRAF-positiven und BRAF-negativen ÜZCa (11 versus 5 Monate) sich nicht signifikant unterscheiden und somit der Nachweis der BRAF-Mutation im kaninen ÜZCa keinen Überlebensnachteil für die betroffenen Hunde darstellt, wurden in den vorliegenden Studien keine weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Überlebenszeit in Korrelation zum Nachweis der BRAF-Mutation durchgeführt.

4.2. Diagnostische Relevanz der BRAF-Mutation im kaninen Übergangszell- und Prostatakarzinom

Die in der vorliegenden Arbeit erforschte BRAF-Mutation konnte erstmals auch in den kaninen Übergangszell- und Prostatakarzinomen der europäischen Hundepopulation nachgewiesen werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben, ist die Durchführung auf die Untersuchung der BRAF-Mutation aus Gewebe und Urin möglich. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zudem, dieses neue Verfahren auch für zytologische Ausstriche von Feinnadelaspiraten (Studien 1 und 3) und Harnsedimenten (Studie 1) zu etablieren (AUPPERLE-LELLBACH et al. 2018; GRASSINGER et al. 2019a).

Im Laufe der Diagnosestellung eines kaninen ÜZCa oder PCa kann die Durchführung des Tests auf die BRAF-Mutation zu mehreren Zeitpunkten indiziert sein und kann helfen, eine Verdachtsdiagnose zu bestätigen bzw. eine endgültige Diagnose zu stellen. So kann u. a. ein Verdacht auf das Vorliegen eines ÜZCa im Rahmen der klinischen Untersuchung eine Indikation für diesen Test darstellen. Ein Hund mit Hamabsatzproblemen, wie Hämaturie, Pollakisurie oder Dysurie bzw. Strangurie, der bereits eine erfolglose, antibiotische Vorbehandlung durchlaufen hat, wäre ein Beispiel hierfür. Da ÜZCa neoplastische Zellen in den Urin abschilfern (WYCISLO und PIECH 2019), kann bei einer ausreichenden Zahl von Tumorzellen im Spontanurin mit Hilfe des Nachweises der BRAF-Mutation aus Urin im Sinne einer Liquid Biopsy (BREEN und WILEY 2018) die Diagnose eines ÜZCa ohne eine invasive Probenentnahme gestellt werden. Dies ermöglicht sowohl eine schnelle als auch eine den Patienten schonende Diagnosestellung mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 36 % bis zu 73 % (je nach Rasse) (AUPPERLE-LELLBACH et al. 2018; GRASSINGER et al. 2019b).

Für Terrier ist eine Rasseprädisposition für das ÜZCa beschrieben (FULKERSON und KNAPP 2015). In Studie 2 konnte für hoch-, mittel- und niederläufige Terrier sowohl eine Rassedisposition für die BRAF-Mutation im ÜZCa als auch für high-grade ÜZCa detektiert werden (GRASSINGER et al. 2019b). Identische Dispositionen für diese Rasse wurden von PANTKE et al. (2018) und AUPPERLE-LELLBACH et al. (2019b) beschrieben. Deshalb kann der Test auf die BRAF-Mutation aus Spontanurin durch die hohe Sensitivität (73 %) in bestimmten Terrier-Rassen als guter Screeningtest auf das Vorliegen eines ÜZCa dienen (BREEN und WILEY 2018; AUPPERLE-LELLBACH et al. 2019b). Dies ermöglicht in den Hochrisiko-Rassen für das kanine ÜZCa einen frühen Diagnosezeitpunkt, erweitert die Therapiechancen sowie die Therapiemöglichkeiten und verbessert so entscheidend die Prognose bei dieser oft sehr spät diagnostizierten Erkrankung.

Auch in Fällen von unkooperativen Patienten, bei denen weiterführende Untersuchungen schwierig oder zum Teil nur unter Allgemeinanästhesie möglich sind, kann durch eine Liquid Biopsy und den Nachweis der BRAF-Mutation aus Spontanurin die Diagnose eines ÜZCa gestellt werden, ohne Tier und Mensch weiter zu belasten.

Des Weiteren bietet die Testdurchführung aus Spontanurin auch für weniger gut ausgestattete Praxen (fehlendes Ultraschallgerät, kein Operationssaal) eine Möglichkeit, die durch BRAF-Mutation verursachten ÜZCa zu diagnostizieren. Im Vergleich zu dem einzigen anderen nicht invasiven, auf dem Markt erhältlichen Test für das canine ÜZCa aus Urin, dem Bladder Tumor-Associated Antigen (V-BTA)-Teststreifen (BORJESSON et al. 1999; BILLET et al. 2002; HENRY 2003), wird weder die Spezifität noch die Sensitivität des Nachweises der BRAF-Mutation durch pathologische Harnbeimengungen (z. B. Blut, Glucose, Proteine oder Eiter) beeinflusst. Genau diese pathologische Harnbeimengungen werden aber oft bei an einem ÜZCa erkrankten Hunden beobachtet (MEUTEN und MEUTEN 2017).

Bei verdächtigen sonographischen Befunden, die auf ein ÜZCa oder PCa hindeuten, seien es fokal anhaftende, unregelmäßige, in das Lumen hineinragende Gewebemassen, Wandverdickungen oder knötchenförmige Zubildungen der Harnblase (PANTKE 2018) oder eine heterogene Echogenität sowie eine marginale, unsymmetrische Vergrößerung oder fokale Mineralisationen der Prostata (FEENEY et al. 1987; EBERHARDT und KIEFER 2015; CHRISTENSEN 2018), kann der Test auf die BRAF-Mutation als ergänzendes Diagnostiktool eingesetzt werden, um eine Diagnose zu stellen. In den Studien 1 und 3 konnte der Test auf den Nachweis der BRAF-Mutation auch für zytologische Ausstriche von Feinnadelaspiraten und Harnsedimenten etabliert werden (AUPPERLE-LELLBACH et al. 2018; GRASSINGER et al. 2019a). Somit kann v. a. bei entnommenen zytologischen Proben, die z. B. wegen sich überlagernder Bilder einer Neoplasie und einer Entzündung in der zytologischen Untersuchung nicht sicher diagnostiziert werden können, durch den Nachweis der BRAF-Mutation eine sichere Diagnose gestellt werden. Sowohl beim ÜZCa (BUDRECKIS et al. 2015) als auch beim PCa (BELL et al. 1995) sind Sekundärinfektionen sehr häufig beschrieben und können die zytologische Diagnosestellung, bedingt durch die reaktive Pleomorphie, erheblich erschweren bis unmöglich machen. Auch bei unklaren histopathologischen Untersuchungen kann durch den Nachweis der BRAF-Mutation sowohl die Diagnose eines ÜZCa als auch die eines PCa gestellt werden. Derartige fragliche Fälle können durch nicht auswertbare Biopsien, z. B. durch Quetschartefakte oder eine zu kleine Probengröße, verursacht werden. Die Spezifität des Nachweises der BRAF-Mutation auf das Vorliegen eines kaninen ÜZCa bzw. PCa liegt wiederum bei 100 %, die Sensitivität des Tests auf diese Mutation liegt für das PCa des Hundes bei 61 % (GRASSINGER et al. 2019a). So kann der Nachweis der BRAF-Mutation auch die zytologische und histopathologische Untersuchung ergänzen und die Diagnose eines

durch die BRAF-Mutation verursachten ÜZCa oder PCa absichern bzw. eine Diagnosestellung ermöglichen. Da der Test sowohl aus den bereits entnommenen Gewebeproben als auch aus den fraglichen zytologischen Präparaten durchgeführt werden kann, lässt sich eine weitere invasive Probenentnahme und somit auch ein zusätzlicher Eingriff unter Allgemeinanästhesie verhindern.

In humanen Ameloblastomen, Schilddrüsenkarzinomen und kolorektalen Neoplasien korreliert der Nachweis der BRAF-Mutation signifikant mit der Aggressivität und einem schlechteren Differenzierungsgrad (ADENIRAN et al. 2006; CHEN et al. 2014; FREGNANI et al. 2017; JANG et al. 2017). Im kaninen ÜZCa konnte in der eigenen Studie 2 hingegen kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis der BRAF-Mutation und dem histologischen Grad der Neoplasie festgestellt werden (GRASSINGER et al. 2019b). Durch die BRAF-Mutation verursachte PCa des Hundes der Studie 3 wiesen aber einen signifikant höheren Gleason-Score auf und waren somit deutlich maligner als PCa, welche nicht durch diese Mutation verursacht waren (GRASSINGER et al. 2019a). Aus diesem Grund stellt der Nachweis der BRAF-Mutation im PCa des Hundes nicht nur eine Möglichkeit zur Diagnosestellung dar, sondern weist auch auf eine hochmaligne Form dieser Neoplasie hin. Obwohl PANTKE et al. (2019) keine signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis der BRAF-Mutation und der Überlebenszeit von Hunden mit ÜZCa gefunden haben, sollte der genaue prognostische Wert des Nachweises der BRAF-Mutation im PCa aufgrund des stärker ausgeprägten malignen Charakters von durch diese Mutation verursachten PCa zweifelsohne in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Da es sich bei der BRAF-Variante um eine somatische Mutation handelt, die nur in Tumorzellen nachweisbar ist (DAVIES et al. 2002), ist zu beachten, dass eine ausreichende Menge an neoplastischen Zellen im jeweiligen Probenmaterial unabdingbar ist und nur der positive Befund als beweisend für ein ÜZCa oder PCa anzusehen ist.

Eine Studie hinsichtlich der Prävalenz der BRAF-Mutation in Neoplasien unterschiedlicher Lokalisationen des kaninen Harntraktes zeigt, dass Nierenkarzinome nur selten (1/16), Harnröhren- und Harnblasenkarzinome hingegen sehr häufig (16/28 bzw. 36/78) durch diese Mutation bedingt sind (AUPPERLE-LELLBACH et al. 2019a).

Erste Untersuchungen zur BRAF-Mutation im ÜZCa der Katze zeigten, dass diese Mutation, anders als beim Hund, im ÜZCa dieser Spezies nicht nachweisbar ist und somit höchstwahrscheinlich auch nicht an der Pathogenese des felinen ÜZCa beteiligt ist (HOHLOCH et al. 2019).

4.3. Therapeutische Relevanz der BRAF-Mutation im kaninen Übergangszell- und Prostatakarzinom

In der Humanmedizin werden seit geraumer Zeit verschiedene RAF-Inhibitoren (Sorafenib, Vemurafenib, Dabrafenib) (MONTOR et al. 2018; WANG et al. 2019) v. a. zur Behandlung von durch die BRAF-Mutation verursachten Melanomen eingesetzt (CHAPMAN et al. 2011; KAROULIA et al. 2017). Obgleich die identische Mutation beim Menschen nicht nur in Melanomen, sondern auch in kolorektalen und thyroidalen Neoplasien nachgewiesen wurde, sprechen diese schlechter auf eine Behandlung mit RAF-Inhibitoren an (PRAHALLAD et al. 2012; MONTERO-CONDE et al. 2013).

RAF-Inhibitoren wirken, indem sie die RAF-Kinase stabilisieren und so zu einer allosterischen Hemmung der Aktivität dieses durch die Mutation hochregulierten Enzyms führen (KAROULIA et al. 2017). Obwohl eine Therapie mit RAF-Inhibitoren selten kurativ ist, kann dadurch die Überlebenszeit von Patienten mit BRAF-positiven Neoplasien deutlich verlängert werden (KAROULIA et al. 2017). Interessanterweise inhibieren diese Wirkstoffe in Tumorzellen ohne diese Mutation (Wildtyp-Tumoren) nicht die Enzymaktivität der RAF-Kinase, sondern steigern diese sogar („RAF-Inhibitor-Paradox“) (KAROULIA et al. 2017; LORENTZEN 2019). Es wird angenommen, dass diese paradoxe Aktivierung das in präklinischen Modellen beobachtete Tumorwachstum, die Metastasierung (HATZIVASSILIOU et al. 2010; SANCHEZ-LAORDEN et al. 2014) sowie die klinischen Nebenwirkungen erklärt (CHAPMAN et al. 2011). Deshalb sind in der Humanmedizin RAF-Inhibitoren (v. a. Vemurafenib und Dabrafenib) in der Behandlung von BRAF-Wildtyp-Tumorpatienten absolut kontraindiziert (PENG et al. 2015).

In Zellkulturversuchen konnten DECKER et al. (2015) in kaninen ÜZCa-Zelllinien mit BRAF-Mutation im Vergleich zu Zelllinien ohne diese Mutation ebenfalls ein gesteigertes Level phosphorylierter und somit mitogen-aktivierter Proteinkinase (MEK) nachweisen. In anschließenden Versuchen konnte diese MEK-Expression durch die Applikation des RAF-Inhibitors Vemurafenib vermindert werden (DECKER et al. 2015). Laut WILEY et al. (2019) sind auch die ersten Resultate von Vemurafenib in einem klinischen Versuch von KNAPP (unpublizierte Daten, 2018) an kaninen ÜZCa vielversprechend. Tumorreaktionen auf den RAF-Inhibitor waren dabei in 31 Hunden zu beobachten, mit einer Remission in 39 % der Hunde, stabiler Erkrankung in 55 % und progressiver Erkrankung in nur 6 % der Hunde. Das aktuelle mediane progressionsfreie Intervall lag in dieser Studie bei 152 Tagen und die aktuelle mediane Überlebenszeit bei 204 Tagen (KNAPP 2018). Somit verspricht der Einsatz des selektiven RAF-Inhibitors Vemurafenib in der Therapie von durch die BRAF-Mutation verursachten ÜZCa und eventuell auch bei PCa des Hundes eine große Chance, deren

Lebensqualität und Überlebenszeit deutlich zu verbessern. Zum jetzigen Zeitpunkt sind jedoch für die Tiermedizin keine RAF-Inhibitoren zugelassen.

Der Nachweis der BRAF-Mutation bietet somit hinsichtlich der Therapie mit RAF-Inhibitoren möglicherweise auch in der Tiermedizin eine Möglichkeit der personalisierten Krebsbehandlung. Weitere klinische Studien bezüglich der Anwendung von RAF-Inhibitoren in der Behandlung BRAF-positiver Neoplasien sind jedoch notwendig.

Bereits routinemäßig in der Behandlung kaniner ÜZCa eingesetzt werden COX-2-Inhibitoren (KNAPP et al. 1994; PANTKE 2018). Deren genauer Wirkmechanismus ist jedoch noch unklar (KNOTTENBELT et al. 2006). Diskutiert wird eine Entfaltung der Wirkung über die Hemmung der Angiogenese und Induktion der Apoptose (MOHAMMED et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte in Studie 2 in ÜZCa von Nicht-Terriern ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis der BRAF-Mutation und der COX-2-Expression gezeigt werden (GRASSINGER et al. 2019b). Eine identische Beobachtung machten JIN et al. (2018) in humanen kolorektalen Karzinomen. In deren Studie wurde vermutet, dass die Expression von COX-2 durch den insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1-Rezeptor (IGF-1R) vermittelt wird, wie es in Pankreaskarzinomen des Menschen beschrieben ist. In humanen Pankreaskarzinomen führt das Vorliegen der BRAF-Mutation über die Aktivierung des MAPK/(Erk-1/2)-Weges („pathway“) zu einer Hemmung des IGF-1R-Inhibitors, was wiederum zu einer gesteigerten Expression des IGF-1R führt (HUANG et al. 2015). Der IGF-1R führt seinerseits wiederum über eine Aktivierung eines spezifischen Weges zu einer COX-2-Induktion im kolorektalen Karzinom (STOELTZING et al. 2007). Ob diese Pathomechanismen aus der Forschung humaner Pankreas- und kolorektaler Karzinome auch auf das kanine ÜZCa übertragen werden kann, muss in weiteren Studien geklärt werden. Grundsätzlich kann der Einsatz von COX-2-Inhibitoren bei durch die BRAF-Mutation verursachten ÜZCa von Nicht-Terrier-Hunden empfohlen werden. In Terrier-Rassen scheinen ÜZCa unabhängig von der BRAF-Mutation eine COX-2-Expression zu zeigen (GRASSINGER et al. 2019b), weshalb in diesem Fall unabhängig vom Nachweis der BRAF-Mutation der Einsatz von COX-2-Inhibitoren indiziert scheint. Weitere Studien hinsichtlich der Ursache der COX-2-Expression in ÜZCa von Terrier-Rassen sollten durchgeführt werden, um zu klären, ob dies unabhängig von der BRAF-Mutation eventuell, wie in humanen kolorektalen Karzinomen und Pankreaskarzinomen, auch durch eine Hemmung des IGF-1R-Inhibitors bedingt sein kann.

In der Humanmedizin entwickeln allein mit RAF-Inhibitoren behandelte BRAF-positive Melanompatienten in 1–30 % der Fälle Keratoakanthome und kutane Plattenepithelkarzinome (ESCUIN-ORDINAS et al. 2014). Die Kombination des COX-2-Inhibitors Celecoxib mit dem BRAF-Inhibitor PLX7420 verzögerte und unterdrückte dies

signifikant (ESCUIN-ORDINAS et al. 2014). Ob diese in der Humanmedizin beschriebenen Neoplasien der Haut als Nebeneffekt auch bei mit RAF-Inhibitoren behandelten Hunden auftritt, bleibt abzuwarten. Eine Kombination von COX- und BRAF-Inhibitoren könnte jedoch in der Therapie von durch die BRAF-Mutation verursachten Neoplasien des Hundes in mehrfacher Hinsicht sinnvoll sein und sollte ebenfalls in weiteren klinischen Studien geprüft werden.

5. Zusammenfassung

Julia Maria Grassinger

„Histologische, immunhistologische und molekulargenetische Untersuchungen zur BRAF-Variante V595E im kaninen Übergangszell- und Prostatakarzinom“

Die aus der Humanmedizin bekannte BRAF-Variante V595E wurde erstmals 2015 von MOCHIZUKI et al. (2015a) in Übergangszellkarzinomen (ÜZCa) und Prostatakarzinomen (PCa) des Hundes nachgewiesen. Ziele der vorliegenden Arbeit waren, zum ersten Mal auch für zytologische Ausstriche von Harnsedimenten und Feinnadelaspiraten ein Nachweisverfahren zu etablieren, die diagnostische Relevanz der BRAF-Mutation in den beiden genannten kaninen Neoplasien erstmals auch in der europäischen Hundepopulation zu untersuchen sowie den Zusammenhang zwischen der BRAF-Mutation, den histologischen Befunden und der immunhistologischen COX-2-Expression im ÜZCa zu erforschen. Dazu wurden aus den Routineeinsendungen an die Firma LABOKLIN GmbH & Co. KG und an das Institut für Tierpathologie der Universität Berlin in den Studien 1 und 2 insgesamt 101 Biopate (Studie 1: n = 36; Studie 2: n = 65), 48 Urinproben und/oder 31 zytologische Ausstriche der Harnblase von Hunden mit ÜZCa (n = 98; Studie 1: n = 33; Studie 2: n = 65), Zystitis (Studie 1: n = 23), Harnblasenpolypen (Studie 1: n = 7) oder ohne pathologische Veränderungen (Studie 1: n = 3) histologisch, immunhistologisch und molekulargenetisch untersucht. In Studie 3 wurden 70 Biopsien und 17 zytologische Ausstriche der Prostata mit PCa (n = 46, davon zytologisch: n = 11), benigner Prostatahyperplasie (n = 22), Prostatitis (n = 14), Plattenepithelmetaplasie (n = 2) und Atrophie der Prostata (n = 3) ebenfalls aus den Routineeinsendungen an die Firma LABOKLIN GmbH & Co. KG histologisch und molekulargenetisch untersucht.

Das Verfahren des Nachweises der BRAF-Mutation konnte erfolgreich für zytologische Ausstriche etabliert werden (Studie 1: ÜZCa, Studie 3: PCa) und die Mutation auch in den ÜZCa und PCa der europäischen Hundepopulation nachgewiesen werden (Studien 1 und 2 (ÜZCa): Terrier: 88 bzw. 73 %, Nicht-Terrier: 65 bzw. 36 %; Studie 3 (PCa): 61 %). Da in keiner der untersuchten Proben mit den genannten anderen Erkrankungen die BRAF-Mutation nachgewiesen werden konnte, handelt es sich um ein hochspezifisches (100 %) Verfahren, das eine sehr gute Ergänzung in der Diagnostik beider Neoplasien des Hundes darstellt. Durch die BRAF-Mutation bedingte PCa wiesen einen signifikant höheren Gleason-Score (schlechter differenziertes vorherrschendes Wachstumsmuster) auf als PCa ohne diese Mutation. Im Gegensatz dazu konnte in Studie 2 kein Zusammenhang zwischen der BRAF-Mutation und dem histologischen Grad (low- vs. high-grade) der ÜZCa gezeigt werden. Immunhistologisch

konnte im kaninen ÜZCa ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem histologischen Grad und der Intensität der COX-2-Expression festgestellt werden. Bei durch die BRAF-Mutation verursachten ÜZCa von Hunden der Nicht-Terrier-Rassen konnte jedoch eine höhere Intensität der COX-2-Expression detektiert werden als in ÜZCa ohne diese Mutation. Dieser Zusammenhang ließ sich aber nicht auf ÜZCa von Terriern übertragen. Letztere zeigten unabhängig vom Vorliegen der BRAF-Mutation eine stärkere COX-2-Expression als ÜZCa anderer Rassen. Die klinische, therapeutische und prognostische Relevanz dieser Befunde ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht absehbar. Der Nachweis der BRAF-Mutation stellt in der Tiermedizin jedoch ein innovatives molekulargenetisches Verfahren dar, welches in Zukunft eine personalisierte Therapie von kaninen ÜZCa und PCa mit COX- und RAF-Inhibitoren ermöglichen könnte. Studien zum Einsatz von RAF-Inhibitoren in der Behandlung BRAF-positiver Neoplasien des Hundes sollten deshalb unbedingt forciert werden.

6. Summary

Julia Maria Grassinger

”Histological, immunohistochemical and molecular genetic investigation of BRAF variant V595E in canine transitional cell and prostate carcinoma”

BRAF variant V595E, which is well known in human medicine, was detected in canine transitional cell carcinomas (TCC) and prostate carcinomas (PCa) for the first time in 2015 by MOCHIZUKI et al. (2015a). The aims of the present studies were to also establish a detection method for cytological smears of urinary sediment and fine-needle aspirates, to detect the BRAF mutation in these two types of neoplasia within the European dog population and to investigate the correlation between the BRAF mutation, the histological findings and the immunohistochemical COX-2 expression in canine TCC. Therefore, in studies 1 and 2, 101 biopsies (study 1: n = 36, study 2: n = 65), 48 urine samples and/or 31 cytological smears of the urinary bladder from dogs with TCC (n = 98, study 1: n = 33, study 2: n = 65), cystitis (study 1: n = 23), urinary bladder polyps (study 1: n = 7), or without any bladder diseases (study 1: n = 3), submitted for routine diagnostics to LABOKLIN GmbH and Co. KG and the Institute of Veterinary Pathology of the University of Berlin, were examined histologically, immunohistochemically and molecular genetically. In study 3, 70 biopsies and 17 cytological smears of the prostate with PCa (n = 46, cytological: n = 11), benign prostate hyperplasia (n = 22), prostatitis (n = 14), squamous epithelial metaplasia (n = 2) and atrophy of the prostate (n = 3), also submitted for routine diagnostics to LABOKLIN GmbH and Co. KG, were examined histologically and molecular genetically.

The method of BRAF mutation detection was successfully established for cytological smears from canine TCC (study 1) and PCa (study 3). Furthermore, the BRAF mutation was found in TCC and PCa of the European dog population (studies 1 and 2 (TCC): terrier: 88 and 73%; non-terrier: 65 and 36%; study 3 (PCa): 61%). This mutation could not be detected in any of the samples examined with the other diseases mentioned. Thus, the detection of BRAF variant V595E is a highly specific method for the diagnosis of canine TCC and PCa and a very good addition to the diagnosis of these two canine neoplasms. PCa with BRAF mutation showed a significantly higher Gleason score (lower differentiation of the predominant growth pattern) than PCa without this mutation. In study 2, however, there was no significant correlation of the BRAF mutation and the histological grade of TCC (low-grade vs. high-grade). Contrary to people, the histological grade of canine TCC was also not significantly correlated to the intensity of COX-2 expression. In non-terriers, though, neoplasms with BRAF mutation showed a significantly higher intensity of COX-2 expression than TCC without this mutation. Yet, this

6. Summary

correlation was not transferable to TCC in terriers. Irrespective of the presence of the BRAF mutation, COX-2 expression intensity was higher in terriers than in TCC of other breeds. The clinical, therapeutical and prognostic relevance of these findings cannot be anticipated at this time. In veterinary medicine, however, the detection of the BRAF mutation is an innovative molecular genetic method which could enable a personalised therapy of canine TCC and PCa in future using COX and RAF inhibitors. Studies regarding the use of RAF inhibitors in the treatment of canine neoplasia caused by BRAF mutation should be encouraged.

7. Literaturverzeichnis

- ABBO AH, JONES DR, MASTERS AR, STEWART JC, FOUREZ L, KNAPP DW (2010): Phase I clinical trial and pharmacokinetics of intravesical mitomycin C in dogs with localized transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Journal of veterinary internal medicine*. 24: 1124–1130.
- ADENIRAN AJ, ZHU Z, GANDHI M, STEWARD DL, FIDLER JP, GIORDANO TJ, BIDDINGER PW, NIKIFOROV YE (2006): Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 30: 216–222.
- AGRAWAL U, KUMARI N, VASUDEVA P, MOHANTY NK, SAXENA S (2018): Overexpression of COX2 indicates poor survival in urothelial bladder cancer. *Annals of diagnostic pathology*. 34: 50–55.
- ALONGE S, MELANDRI M, AIUDI G, LACALANDRA GM (2018a): Advances in prostatic diagnostics in dogs: The role of canine prostatic specific esterase in the early diagnosis of prostatic disorders. *Topics in companion animal medicine*. 33: 105–108.
- ALONGE S, MELANDRI M, LEOCI R, LACALANDRA GM, AIUDI G (2018b): Canine prostate specific esterase (CPSE) as an useful biomarker in preventive screening programme of canine prostate: CPSE threshold value assessment and its correlation with ultrasonographic prostatic abnormalities in asymptomatic dogs. *Reproduction in domestic animals*. 53: 359–364.
- ARNOLD EJ, CHILDRESS MO, FOUREZ LM, TAN KM, STEWART JC, BONNEY PL, KNAPP DW (2011): Clinical trial of vinblastine in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Journal of veterinary internal medicine*. 25: 1385–1390.
- AUPPERLE-LELLBACH H, GRASSINGER J, HOHLOCH C, KEHL A, PANTKE P (2018): Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Biopstaten beim kaninen Harnblasenkarzinom. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*. 5: 289–295.
- AUPPERLE-LELLBACH H, GRASSINGER JM, ERHARD H, KEMPKER L, MERZ S, PANTKE P (2019a): BRAF-mutation in carcinomas of various sites in the canine urinary tract. 29th ECVIM Congress, 19.-21.09.2019 in Mailand, Italien, Congressabstracts, 267.
- AUPPERLE-LELLBACH H, KEHL A, MERZ S, GRASSINGER J, HOHLOCH C, PANTKE P (2019b): Die BRAF-Mutation V595E im Übergangszellkarzinom – Untersuchungen zur Rassedisposition bei Terriern. *Kleintiermedizin*. 1: 30–33.
- AXIAK SM, BIGIO A (2012): Canine prostatic carcinoma. *Compendium (Yardley, PA)*. 34: E1-5.
- BARSANTI JA, FINCO DR (1984): Evaluation of techniques for diagnosis of canine prostatic diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 185: 198–200.

- BELL FW, KLAUSNER JS, HAYDEN DW, FEENEY DA, JOHNSTON SD (1991): Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dogs: 31 cases (1970-1987). *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 199: 1623–1630.
- BELL FW, KLAUSNER JS, HAYDEN DW, LUND EM, LIEBENSTEIN BB, FEENEY DA, JOHNSTON SD, SHIVERS JL, EWING CM, ISAACS WB (1995): Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. *Journal of veterinary internal medicine*. 9: 149–153.
- BENNETT TC, MATZ BM, HENDERSON RA, STRAW RC, LIPTAK JM, SELMIC LE, COLLIVIGNARELLI F, BURACCO P (2018): Total prostatectomy as a treatment for prostatic carcinoma in 25 dogs. *Veterinary surgery*. 47: 367–377.
- BILLET J-PHG, MOORE AH, HOLT PE (2002): Evaluation of a bladder tumor antigen test for the diagnosis of lower urinary tract malignancies in dogs. *American journal of veterinary research*. 63: 370–373.
- BORJESSON DL, CHRISTOPHER MM, LING GV (1999): Detection of canine transitional cell carcinoma using a bladder tumor antigen urine dipstick test. *Veterinary clinical pathology*. 28: 33–38.
- BORJESSON DL, DEJONG K (2016): Urinary Tract. In: R. E. Raskin and Meyer D.J., Hrsg. *Canine and feline Cytology. A color atlas and interpretation guide*, Saunders Elsevier, St. Loise, Missouri: 284–294.
- BRACHA S, MCNAMARA M, HILGART I, MILOVANCEV M, MEDLOCK J, GOODALL C, WICKRAMASEKARA S, MAIER CS (2014): A multiplex biomarker approach for the diagnosis of transitional cell carcinoma from canine urine. *Analytical biochemistry*. 455: 41–47.
- BRADBURY CA, WESTROPP JL, POLLARD RE (2009): Relationship between prostatomegaly, prostatic mineralization, and cytologic diagnosis. *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*. 50: 167–171.
- BREEN M, WILEY C (2018): Flüssigbiopsie - Die Zukunft der Tumordiagnostik? *Veterinary focus*. 28: 39–45.
- BRYAN JN, KEELER MR, HENRY CJ, BRYAN ME, HAHN AW, CALDWELL CW (2007): A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer. *Prostate*. 67: 1174–1181.
- BUDRECKIS DM, BYRNE BA, POLLARD RE, REBHUN RB, RODRIGUEZ CO, SKORUPSKI KA (2015): Bacterial urinary tract infections associated with transitional cell carcinoma in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*. 29: 828–833.
- CAMPOS M, KOOL MMJ, DAMINET S, DUCATELLE R, RUTTEMAN G, KOOISTRA HS, GALAC S, MOL JA (2014): Upregulation of the PI3K/Akt pathway in the tumorigenesis of canine thyroid carcinoma. *Journal of veterinary internal medicine*. 28: 1814–1823.

- CANNON CM, ALLSTADT SD (2015): Lower urinary tract cancer. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice.* 45: 807–824.
- CARVALHO S, STOLL AL, PRIESTNALL SL, SUAREZ-BONNET A, RASSNICK K, LYNCH S, SCHOEPPER I, ROMANELLI G, BURACCO P, ATHERTON M, MERLO EM de, LARA-GARCIA A (2017): Retrospective evaluation of COX-2 expression, histological and clinical factors as prognostic indicators in dogs with renal cell carcinomas undergoing nephrectomy. *Veterinary and comparative oncology.* 15: 1280–1294.
- CERF DJ, LINDQUIST EC (2012): Palliative ultrasound-guided endoscopic diode laser ablation of transitional cell carcinomas of the lower urinary tract in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 240: 51–60.
- CHAPMAN PB, HAUSCHILD A, ROBERT C, HAANEN JB, ASCIERTO P, LARKIN J, DUMMER R, GARBE C, TESTORI A, MAIO M, HOGG D, LORIGAN P, LEBBE C, JOUARY T, SCHADENDORF D, RIBAS A, O'DAY SJ, SOSMAN JA, KIRKWOOD JM, EGGERMONT AMM, DRENO B, NOLOP K, LI J, NELSON B, HOU J, LEE RJ, FLAHERTY KT, MCARTHUR GA (2011): Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine.* 364: 2507–2516.
- CHEN D, HUANG J-F, LIU K, ZHANG L-Q, YANG Z, CHUAI Z-R, WANG Y-X, SHI D-C, HUANG Q, FU W-L (2014): BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS one.* 9: e90607.
- CHILDRESS MO, ADAMS LG, RAMOS-VARA JA, FREEMAN LJ, HE S, CONSTABLE PD, KNAPP DW (2011): Results of biopsy via transurethral cystoscopy and cystotomy for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and urethra in dogs: 92 cases (2003-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 239: 350–356.
- CHRISTENSEN BW (2018): Canine prostate disease. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice.* 48: 701–719.
- CORNELL KK, BOSTWICK DG, COOLEY DM, HALL G, HARVEY HJ, HENDRICK MJ, PAULI BU, RENDER JA, STOICA G, SWEET DC, WATERS DJ (2000): Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: A retrospective analysis of 76 cases. *Prostate.* 45: 173–183.
- CUNTO M, MARIANI E, ANICITO GUIDO E, BALLOTTA G, ZAMBELLI D (2019): Clinical approach to prostatic diseases in the dog. *Reproduction in domestic animals.* 54: 815–822.
- DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, STEPHENS P, EDKINS S, CLEGG S, TEAGUE J, WOFFENDIN H, GARNETT MJ, BOTTOMLEY W, DAVIS N, DICKS E, EWING R, FLOYD Y, GRAY K, HALL S, HAWES R, HUGHES J, KOSMIDOU V, MENZIES A, MOULD C, PARKER A, STEVENS C, WATT S, HOOPER S, WILSON R, JAYATILAKE H, GUSTERSON BA, COOPER C, SHIPLEY J, HARGRAVE D, PRITCHARD-JONES K, MAITLAND N, CHENEVIX-TRENCH G, RIGGINS GJ, BIGNER DD, PALMIERI G, COSSU A, FLANAGAN A, NICHOLSON A, HO JWC, LEUNG SY, YUEN ST, WEBER BL, SEIGLER HF, DARROW TL, PATERSON H, MARAIS R, MARSHALL CJ, WOOSTER R,

- STRATTON MR, FUTREAL PA (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 417: 949–954.
- DECKER B, PARKER HG, DHAWAN D, KWON EM, KARLINS E, DAVIS BW, RAMOS-VARA JA, BONNEY PL, MCNIEL EA, KNAPP DW, OSTRANDER EA (2015): Homologous mutation to human BRAF V600E is common in naturally occurring canine bladder cancer—Evidence for a relevant model system and urine-based diagnostic test. *Molecular cancer research*. 13: 993–1002.
- DELAHUNT B, MILLER RJ, SRIGLEY JR, EVANS AJ, SAMARATUNGA H (2012): Gleason grading: past, present and future. *Histopathology*. 60: 75–86.
- DI DONATO G, LAUFER-AMORIM R, PALMIERI C (2017): Nuclear morphometry in histological specimens of canine prostate cancer: Correlation with histological subtypes, Gleason score, methods of collection and survival time. *Research in veterinary science*. 114: 212–217.
- DUBREUIL P, LETARD S, CIUFOLINI M, GROS L, HUMBERT M, CASTÉRAN N, BERGE L, HAJEM B, LERMET A, SIPPL W, VOISSET E, AROCK M, AUCLAIR C, LEVENTHAL PS, MANSFIELD CD, MOUSSY A, HERMINE O (2009): Mafitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS one*. 4: e7258.
- EBERHARDT F, KIEFER I (2015): Das Prostatakarzinom des Hundes. *Kleintier Konkret*. 18: 22–33.
- EPSTEIN JI (2010): An update of the Gleason grading system. *The Journal of urology*. 183: 433–440.
- ESCUIN-ORDINAS H, ATEFI M, FU Y, CASS A, NG C, HUANG RR, YASHAR S, COMIN-ANDUIX B, AVRAMIS E, COCHRAN AJ, MARAIS R, LO RS, GRAEBER TG, HERSCHMAN HR, RIBAS A (2014): COX-2 inhibition prevents the appearance of cutaneous squamous cell carcinomas accelerated by BRAF inhibitors. *Molecular oncology*. 8: 250–260.
- FAN TM, LORIMIER L-P de, CHARNEY SC, HINTERMEISTER JG (2005): Evaluation of intravenous pamidronate administration in 33 cancer-bearing dogs with primary or secondary bone involvement. *Journal of veterinary internal medicine*. 19: 74–80.
- FEENEY DA, JOHNSTON GR, KLAUSNER JS, PERMAN V, LEININGER JR, TOMLINSON MJ (1987): Canine prostatic disease—comparison of radiographic appearance with morphologic and microbiologic findings: 30 cases (1981–1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 190: 1018–1026.
- FOSTER RA (2007): Männliche Geschlechtsorgane. In: McGavin MD und Zachary JF, Hrsg. *Pathologie der Haustiere, Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*. Elsevier Urban & Fischer, München, 1183–1211.
- FREGNANI ER, PEREZ DEDC, PAES DE ALMEIDA O, FONSECA FP, SOARES FA, CASTRO-JUNIOR G, ALVES FA (2017): BRAF-V600E expression correlates with ameloblastoma aggressiveness. *Histopathology*. 70: 473–484.

- FULKERSON CM, KNAPP DW (2015): Management of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: a review. *Veterinary Journal*. 205: 217–225.
- GLEASON DF (1966): Classification of prostatic carcinomas. *Cancer chemotherapy reports*. 50: 125–128.
- GLEASON DF, MELLINGER GT (1974): Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of urology*. 111: 58–64.
- GLICKMAN LT, SCHOFER FS, MCKEE LJ, REIF JS, GOLDSCHMIDT MH (1989): Epidemiologic study of insecticide exposures, obesity, and risk of bladder cancer in household dogs. *Journal of toxicology and environmental health*. 28: 407–414.
- GRASSINGER JM, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, MERZ S, KLOPFLEISCH R (2019a): Nachweis der BRAF-Mutation bei kaninen Prostataerkrankungen. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*. 47: 313–320.
- GRASSINGER JM, MERZ S, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, KLOPFLEISCH R (2019b): Correlation of BRAF Variant V595E, Breed, Histological Grade and Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Transitional Cell Carcinomas. *Veterinary sciences*. 6. pii: E31.
- GRAUER FG (2010): Erkrankungen der Harnwege. In: Nelson RW und Couto CG, Hrsg. *Innere Medizin der Kleintiere*, Elsevier Urban & Fischer, München: 631–721.
- GRIFFIN MA, CULP WTN, REBHUN RB (2018): Lower urinary tract neoplasia. *Veterinary sciences*. 5. pii: E96.
- HAHN KA, OGILVIE G, OGLIVIE G, RUSK T, DEVAUCHELLE P, LEBLANC A, LEGENDRE A, POWERS B, LEVENTHAL PS, KINET J-P, PALMERINI F, DUBREUIL P, MOUSSY A, HERMINE O (2008): Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *Journal of veterinary internal medicine*. 22: 1301–1309.
- HATZIVASSILIOU G, SONG K, YEN I, BRANDHUBER BJ, ANDERSON DJ, ALVARADO R, LUDLAM MJC, STOKOE D, GLOOR SL, VIGERS G, MORALES T, ALIAGAS I, LIU B, SIDERIS S, HOEFLICH KP, JAISWAL BS, SESHAGIRI S, KOEPPEN H, BELVIN M, FRIEDMAN LS, MALEK S (2010): RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*. 464: 431–435.
- HAYES HM (1976): Canine bladder cancer: epidemiologic features. *American journal of epidemiology*. 104: 673–677.
- HEILMANN RM, MCNIEL EA, GRÜTZNER N, LANERIE DJ, SUCHODOLSKI JS, STEINER JM (2017): Diagnostic performance of the urinary canine calgranulins in dogs with lower urinary or urogenital tract carcinoma. *BMC veterinary research*. 13: 112.
- HELLER DA (2006): An update on diagnosing and treating urinary bladder transitional cell carcinoma in dogs. *Veterinary Medicine*. 101: 369–381.

- HENRY CJ (2003): Management of transitional cell carcinoma. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice.* 33: 597–613.
- HINTERLEITNER M (2005): BRAF Mutation in Melanomen und exokrinen Pankreastumoren bei Hund und Katze. *Hochschulschrift, Veterinärmedizinische Universität Wien.*
- HOHLOCH C, KEHL A, AUPPERLE-LELLBACH H (2019): BRAF Variant V637E is not detectable in biopsies of feline transitional cell carcinoma. *Abstract-ESVCP-ESVCP Congress, Arnheim, Niederlande.*
- HUANG CC, KONG MX, ZHOU M, ROSENKRANTZ AB, TANEJA SS, MELAMED J, DENG F-M (2014): Gleason score 3 + 4=7 prostate cancer with minimal quantity of gleason pattern 4 on needle biopsy is associated with low-risk tumor in radical prostatectomy specimen. *The American journal of surgical pathology.* 38: 1096–1101.
- HUANG F, CHANG H, GREER A, HILLERMAN S, REEVES KA, HURLBURT W, COGSWELL J, PATEL D, QI Z, FAIRCHILD C, RYSECK R-P, WONG TW, FINCKENSTEIN FG, JACKSON J, CARBONI JM (2015): IRS2 copy number gain, KRAS and BRAF mutation status as predictive biomarkers for response to the IGF-1R/IR inhibitor BMS-754807 in colorectal cancer cell lines. *Molecular cancer therapeutics.* 14: 620–630.
- JANG MH, KIM S, HWANG DY, KIM WY, LIM SD, KIM WS, HWANG TS, HAN HS (2017): BRAF-mutated colorectal cancer exhibits distinct clinicopathological features from wild-type BRAF-expressing cancer independent of the microsatellite instability status. *Journal of Korean medical science.* 32: 38–46.
- JIN M, LONG Z-W, YANG J, LIN X (2018): Correlations of IGF-1R and COX-2 expressions with Ras and BRAF genetic mutations, clinicopathological features and prognosis of colorectal cancer patients. *Pathology oncology research.* 24: 45–57.
- JOHNSON CA (2010): Störungen der Prostata. In: Nelson RW und Couto CG, Hrsg. *Innere Medizin der Kleintiere*, Elsevier Urban & Fischer, München: 1011–1019.
- KAROULIA Z, GAVATHIOTIS E, POULIKAKOS PI (2017): New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nature reviews. Cancer.* 17: 676–691.
- KENNEDY PC (1998): *Histological classification of tumors of the genital system of domestic animals*. WHO international histological classification of tumors of domestic animals second series 4. Armed Forces Inst. of Pathology, Washington, DC.
- KENT MS, ZWINGENBERGER A, WESTROPP JL, BARRETT LE, DURBIN-JOHNSON BP, GHOSH P, VINALL RL (2017): MicroRNA profiling of dogs with transitional cell carcinoma of the bladder using blood and urine samples. *BMC Veterinary Research.* 13: 339.
- KHADIDJA M, ADEL A (2017): Canine prostatitis disorders. *Open Journal of Veterinary Medicine.* 2: 83–90.
- KHAN KN, KNAPP DW, DENICOLA DB, HARRIS RK (2000): Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *American journal of veterinary research.* 61: 478–481.

- KNAPP DW (2018): Antitumor effects, safety, and mechanisms of resistance of BRAFtargeted therapy in dogs with naturally-occurring invasive urothelial carcinoma. *American College of Veterinary Pathology Annual Meeting. Washington, DC.*
- KNAPP DW, GLICKMAN NW, DENICOLA DB, BONNEY PL, LIN TL, GLICKMAN LT (2000a): Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 5: 47–59.
- KNAPP DW, GLICKMAN NW, WIDMER WR, DENICOLA DB, ADAMS LG, KUCZEK T, BONNEY PL, DEGORTARI AE, HAN C, GLICKMAN LT (2000b): Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 46: 221–226.
- KNAPP DW, MCMILLAN SK (2013): Tumors of the urinary system. In: WITHROW SJ and VAIL DM, Hrsg. *Withrow&MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, Saunders Elsevier, St. Louis: 572–582.
- KNAPP DW, RICHARDSON RC, CHAN TC, BOTTOMS GD, WIDMER WR, DENICOLA DB, TECLAW R, BONNEY PL, KUCZEK T (1994): Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Journal of veterinary internal medicine*. 8: 273–278.
- KNAPP DW, RUPLE-CZERNIAK A, RAMOS-VARA JA, NAUGHTON JF, FULKERSON CM, HONKISZ SI (2016): A nonselective cyclooxygenase inhibitor enhances the activity of vinblastine in a naturally-occurring canine model of invasive urothelial carcinoma. *Bladder Cancer*. 2: 241–250.
- KNOTTENBELT C, MELLOR D, NIXON C, THOMPSON H, ARGYLE DJ (2006): Cohort study of COX-1 and COX-2 expression in canine rectal and bladder tumours. *The Journal of small animal practice*. 47: 196–200.
- KOBAYASHI M, SAITO A, TANAKA Y, MICHISHITA M, KOBAYASHI M, IRIMAJIRI M, KANEDA T, OCHIAI K, BONKOBARA M, TAKAHASHI K, HORI T, KAWAKAMI E (2017): MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. *The Journal of veterinary medical science*. 79: 719–725.
- KÖMHOFF M, GUAN Y, SHAPPELL HW, DAVIS L, JACK G, SHYR Y, KOCH MO, SHAPPELL SB, BREYER MD (2000): Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas. *The American Journal of Pathology*. 157: 29–35.
- KWELDAM CF, WILDHAGEN MF, BANGMA CH, VAN LEENDERS GJLH (2015): Disease-specific death and metastasis do not occur in patients with Gleason score ≤6 at radical prostatectomy. *BJU international*. 116: 230–235.
- LEE J-Y, TANABE S, SHIMOHIRA H, KOBAYASHI Y, OOMACHI T, AZUMA S, OGIHARA K, INOKUMA H (2007): Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. *Research in veterinary science*. 83: 210–216.

- LEROY BE, NORTHRUP N (2009): Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Veterinary journal*. 180: 149–162.
- LETARD S, YANG Y, HANSSSENS K, PALMÉRINI F, LEVENTHAL PS, GUÉRY S, MOUSSY A, KINET J-P, HERMINE O, DUBREUIL P (2008): Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular cancer research*. 6: 1137–1145.
- LIPTAK JM, BRUTSCHER SP, MONNET E, DERNELL WS, TWEDT DC, KAZMIERSKI KJ, WALTER CU, MULLINS MN, LARUE SM, WITHROW SJ (2004): Transurethral resection in the management of urethral and prostatic neoplasia in 6 dogs. *Veterinary surgery*. 33: 505–516.
- LORENTZEN HF (2019): Targeted therapy for malignant melanoma. *Current opinion in pharmacology*. 46: 116–121.
- MACY DW (1983): Transitional cell carcinoma of the bladder associated with cyclophosphamide administration. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 19: 965–969.
- MADEWELL BR, DEITCH AD, HIGGINS RJ, MARKS SL, DEVERE WHITE RW (1991): DNA flow cytometric study of the hyperplastic and neoplastic canine prostate. *Prostate*. 18: 173–179.
- MAEDA S, TOMIYASU H, TSUBOI M, INOUE A, ISHIHARA G, UCHIKAI T, CHAMBERS JK, UCHIDA K, YONEZAWA T, MATSUKI N (2018): Comprehensive gene expression analysis of canine invasive urothelial bladder carcinoma by RNA-Seq. *BMC cancer*. 18: 472.
- MARCONATO L, ZINI E, LINDNER D, SUSLAK-BROWN L, NELSON V, JEGLUM AK (2011): Toxic effects and antitumor response of gemcitabine in combination with piroxicam treatment in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 238: 1004–1010.
- MARVEL SJ, SÉGUIN B, DAILEY DD, THAMM DH (2017): Clinical outcome of partial cystectomy for transitional cell carcinoma of the canine bladder. *Veterinary and comparative oncology*. 15: 1417–1427.
- MCMILLAN SK, KNAPP DW, RAMOS-VARA JA, BONNEY PL, ADAMS LG (2012): Outcome of urethral stent placement for management of urethral obstruction secondary to transitional cell carcinoma in dogs: 19 cases (2007-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 241: 1627–1632.
- MEUTEN D, MEUTEN TL (2017): *Tumours of the urinary system*. In: MEUTEN DJ, Hrsg. *Tumors in Domestic Animals*. Ames, Iowa: 632–688.
- MOCHIZUKI H, KENNEDY K, SHAPIRO SG, BREEN M (2015a): BRAF mutations in canine cancers. *PLoS one*. 10: e0129534.
- MOCHIZUKI H, BREEN M (2015): Comparative aspects of BRAF mutations in canine cancers. *Veterinary sciences*. 2: 231–245.

- MOCHIZUKI H, SHAPIRO SG, BREEN M (2015b): Detection of BRAF mutation in urine DNA as a molecular diagnostic for canine urothelial and prostatic carcinoma. *PLoS one*. 10: e0144170.
- MOHAMMED SI, BENNETT PF, CRAIG BA, GLICKMAN NW, MUTSAERS AJ, SNYDER PW, WIDMER WR, DEGORTARI AE, BONNEY PL, KNAPP DW (2002): Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer research*. 62: 356–358.
- MOHAMMED SI, KHAN KNM, SELLERS RS, HAYEK MG, DENICOLA DB, WU L, BONNEY PL, KNAPP DW (2004): Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 70: 479–483.
- MONTERO-CONDE C, RUIZ-LLORENTE S, DOMINGUEZ JM, KNAUF JA, VIALE A, SHERMAN EJ, RYDER M, GHOSSEIN RA, ROSEN N, FAGIN JA (2013): Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. *Cancer discovery*. 3: 520–533.
- MONTOR WR, SALAS AROSE, MELO FHM de (2018): Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. *Molecular cancer*. 17: 55.
- MOORE AS, CARDONA A, SHAPIRO W, MADEWELL BR (1990): Cisplatin (cisdiamminedichloroplatinum) for treatment of transitional cell carcinoma of the urinary bladder or urethra. A retrospective study of 15 dogs. *Journal of veterinary internal medicine*. 4: 148–152.
- MUTSAERS AJ, WIDMER WR, KNAPP DW (2003): Canine transitional cell carcinoma. *Journal of veterinary internal medicine*. 17: 136–144.
- NORRIS AM, LAING EJ, VALLI VEO, WITHROW SJ, MACY DW, OGILVIE GK, TOMLINSON J, MCCAWE D, PIDGEON G, JACOBS RM (1992): Canine bladder and urethral tumors: A retrospective study of 115 cases (1980-1985). *Journal of veterinary internal medicine*. 6: 145–153.
- NYLAND TG, WALLACK ST, WISNER ER (2002): Needle-tract implantation following us-guided fine-needle aspiration biopsy of transitional cell carcinoma of the bladder, urethra, and prostate. *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*. 43: 50–53.
- PALLAORO A, MIRSAFAVI RY, CULP WTN, BRAUN GB, MEINHART CD, MOSKOVITS M (2018): Screening for canine transitional cell carcinoma (TCC) by SERS-based quantitative urine cytology. *Nanomedicine*. 14: 1279–1287.
- PALMIERI C, GRIECO V (2015): Proposal of Gleason-like grading system of canine prostate carcinoma in veterinary pathology practice. *Research in veterinary science*. 103: 11–15.

- PALMIERI C, LEAN FZ, AKTER SH, ROMUSSI S, GRIECO V (2014): A retrospective analysis of 111 canine prostatic samples: histopathological findings and classification. *Research in veterinary science*. 97: 568–573.
- PANTKE P (2018): Diagnostik und Therapie des Übergangszellkarzinoms des unteren Harntraktes beim Hund. *Kleintierpraxis*. 63: 76–92.
- PANTKE P, DIEKMANN C, HETTIG M, AUPPERLE-LELLBACH H (2019): Prognostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in transurethralen Biopsien von Hunden mit Übergangszellkarzinom. *Kleintierpraxis*: accepted.
- PANTKE P, KEHL A, AUPPERLE-LELLBACH H (2018): Gegenüberstellung von Hunden mit und ohne biotisch gestützten Nachweis der BRAF-Mutation im Übergangszellkarzinom bei Erkrankungen des unteren Harntraktes. *Kleintierpraxis*. 63: 542–546.
- PATRICK DJ, FITZGERALD SD, SESTERHENN IA, DAVIS CJ, KIUPEL M (2006): Classification of canine urinary bladder urothelial tumours based on the World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification. *Journal of comparative pathology*. 135: 190–199.
- PENG S-B, HENRY JR, KAUFMAN MD, LU W-P, SMITH BD, VOGETI S, RUTKOSKI T J, WISE S, CHUN L, ZHANG Y, VAN HORN RD, YIN T, ZHANG X, YADAV V, CHEN S-H, GONG X, MA X, WEBSTER Y, BUCHANAN S, MOCHALKIN I, HUBER L, KAYS L, DONOHO GP, WALGREN J, MCCANN D, PATEL P, CONTI I, PLOWMAN GD, STARLING JJ, FLYNN DL (2015): Inhibition of RAF isoforms and active dimers by LY3009120 leads to anti-tumor activities in RAS or BRAF mutant cancers. *Cancer cell*. 28: 384–398.
- PEYSSONNAUX C, EYCHÈNE A (2001): The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the cell*. 93: 53–62.
- PINHEIRO D, MACHADO J, VIEGAS C, BAPTISTA C, BASTOS E, MAGALHÃES J, PIRES MA, CARDOSO L, MARTINS-BESSA A (2017): Evaluation of biomarker canine-prostate specific arginine esterase (CPSE) for the diagnosis of benign prostatic hyperplasia. *BMC veterinary research*. 13: 76.
- POIRIER VJ, FORREST LJ, ADAMS WM, VAIL DM (2004): Piroxicam, mitoxantrone, and coarse fraction radiotherapy for the treatment of transitional cell carcinoma of the bladder in 10 dogs: a pilot study. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 40: 131–136.
- POWE JR, CANFIELD PJ, MARTIN PA (2004): Evaluation of the cytologic diagnosis of canine prostatic disorders. *Veterinary clinical pathology*. 33: 150–154.
- PRAHALLAD A, SUN C, HUANG S, DI NICOLANTONIO F, SALAZAR R, ZECCHIN D, BEIJERSBERGEN RL, BARDELLI A, BERNARDS R (2012): Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*. 483: 100–103.

- PRIESTER WA, MCKAY FW (1986): The occurrence of tumors in domestic animals. *Monogr Natl Cancer Inst. Prepared by Epizootology Section, Clinical Epidemiology Branch, Field Studies and Statistics Program, Division of Cancer Cause and Prevention. Bethesda*: 110.
- RAVICINI S, BAINES SJ, TAYLOR A, AMORES-FUSTER I, MASON SL, TREGGIARI E (2018): Outcome and prognostic factors in medically treated canine prostatic carcinomas: A multi-institutional study. *Veterinary and comparative oncology*. 16: 450–458.
- RODAK O, DZIMIRA S, PODOLAK A, PŁÓCIENNIK M, NIŻAŃSKI W (2018): Accuracy of ultrasonography and fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of prostate diseases in dogs. *Reproduction in domestic animals*. 53: 79–84.
- SANCHEZ-LAORDEN B, VIROS A, GIROTTI MR, PEDERSEN M, SATURNO G, ZAMBON A, NICULESCU-DUVAZ D, TURAJLIC S, HAYES A, GORE M, LARKIN J, LORIGAN P, COOK M, SPRINGER C, MARAIS R (2014): BRAF inhibitors induce metastasis in RAS mutant or inhibitor-resistant melanoma cells by reactivating MEK and ERK signaling. *Science signaling*. 7: ra30.
- SATO S, WATANABE M, TANIUCHI S, KASAJIMA A, MITSUZUKA K, NAKAMURA Y, FUJISHIMA F, ARAI Y, SASANO H (2015): Precise preoperative localization of prostate cancer employing 12-core needle biopsy with a tissue-marking method for effective surgical strategy. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 236: 55–61.
- SCHREMPP DR, CHILDRESS MO, STEWART JC, LEACH TN, TAN KM, ABBO AH, GORTARI AE de, BONNEY PL, KNAPP DW (2013): Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 242: 1534–1538.
- SHARIAT SF, MATSUMOTO K, KIM J, AYALA GE, ZHOU J-H, JIAN W, BENEDICT WF, LERNER SP (2003): Correlation of cyclooxygenase-2 expression with molecular markers, pathological features and clinical outcome of transitional cell carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*. 170: 985–989.
- SHELLY S, CHIEN MB, YIP B, KENT MS, THEON AP, MCCALLAN JL, LONDON CA (2005): Exon 15 BRAF mutations are uncommon in canine oral malignant melanomas. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*. 16: 211–217.
- SMITH J (2008): Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology*. 70: 375–383.
- SOLANO-GALLEGO L, MASSERDOTTI C (2016): Reproductive System. In: RASKIN RE und MEYER DJ, Hrsg. *Canine and feline Cytology. A color atlas and interpretation guide*. Saunders Elsevier, St. Loise, Missouri: 313–352.
- SORENMO KU, GOLDSCHMIDT M, SHOFER F, GOLDKAMP C, FERRACONE J (2003): Immunohistochemical characterization of canine prostatic carcinoma and correlation with castration status and castration time. *Veterinary and comparative oncology*. 1: 48–56.
- SORENMO KU, GOLDSCHMIDT MH, SHOFER FS, GOLDKAMP C, FERRACONE J (2004): Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of

- cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. *Veterinary and comparative oncology*. 2: 13–23.
- SOTIRAKOPOULOS AJ, ARMSTRONG PJ, HEATH L, MADRILL NJ, MCNIEL EA (2010): Evaluation of microsatellite instability in urine for the diagnosis of transitional cell carcinoma of the lower urinary tract in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*. 24: 1445–1451.
- STOELTZING O, LIU W, FAN F, WAGNER C, STENGEL K, SOMCIO RJ, REINMUTH N, PARIKH AA, HICKLIN DJ, ELLIS LM (2007): Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human pancreatic carcinoma cells by the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) system. *Cancer letters*. 258: 291–300.
- TABRIZ HM, OLFATI G, AHMADI SA, YUSEFNIA S (2013): Cyclooxygenase-2 expression in urinary bladder transitional cell carcinoma and its association with clinicopathological characteristics. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 14: 4539–4543.
- TESKE E, NAAN EC, VAN DIJK EM, VAN GARDEREN E, SCHALKEN JA (2002): Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Molecular and cellular endocrinology*. 197: 251–255.
- VALLI VE, NORRIS A, JACOBS RM, LAING E, WITHROW S, MACY D, TOMLINSON J, MCCAWE D, OGILVIE GK, PIDGEON G (1995): Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. *Journal of comparative pathology*. 113: 113–130.
- VINALL RL, KENT MS, DEVERE WHITE RW (2012): Expression of microRNAs in urinary bladder samples obtained from dogs with grossly normal bladders, inflammatory bladder disease, or transitional cell carcinoma. *American Journal of Veterinary Research*. 73: 1626–33.
- VLASIN M, RAUSER P, FICHEL T, NECAS A (2006): Subtotal intracapsular prostatectomy as a useful treatment for advanced-stage prostatic malignancies. *The Journal of small animal practice*. 47: 512–516.
- WALKER M, BREIDER M (1987): Intraoperative radiotherapy of canine bladder cancer. *Veterinary Radiology*. 28: 200–204.
- WANG P-F, QIU H-Y, ZHU H-L (2019): A patent review of BRAF inhibitors: 2013-2018. *Expert opinion on therapeutic patents*. 29: 595–603.
- WEAVER A (1981): Fifteen cases of prostatic carcinoma in the dog. *Veterinary Record*. 109: 71–75.
- WEBER J, KEMPKER L, AUPPERLE-LELLBACH H (2017): Knochenmetastasen eines Prostatakarzinoms bei einem Hund. *Kleintiermedizin*. 4: 152–157.
- WEISSE C, BERENT A, TODD K, CLIFFORD C, SOLOMON J (2006): Evaluation of palliative stenting for management of malignant urethral obstructions in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 229: 226–234.

- WELLER RE, WOLF AM, OYEJIDE A (1979): Transitional cell carcinoma of the bladder associated with cyclophosphamide therapy in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 5: 733–736.
- WILEY C, WISE CF, BREEN M (2019): Novel noninvasive diagnostics. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*. 49: 781–791.
- WINKLER S, MURUA ESCOBAR H, EBERLE N, REIMANN-BERG N, NOLTE I, BULLERDIEK J (2005): Establishment of a cell line derived from a canine prostate carcinoma with a highly rearranged karyotype. *The Journal of heredity*. 96: 782–785.
- WINKLER S, REIMANN-BERG N, MURUA ESCOBAR H, LOESCHKE S, EBERLE N, HÖINGHAUS R, NOLTE I, BULLERDIEK J (2006): Polysomy 13 in a canine prostate carcinoma underlining its significance in the development of prostate cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*. 169: 154–158.
- WYCISLO KL, PIECH TL (2019): Urinary tract cytology. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*. 49: 247–260.

8. Publikationsverzeichnis

AUPPERLE-LELLBACH H, GRASSINGER J, HOHLOCH C, KEHL A, PANTKE P (2018): Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Biopaten beim kaninen Übergangszellkarzinom. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere. 46: 289–295.

GRASSINGER J, PANTKE P, KEMPKER L, ERHARD H, AUPPERLE-LELLBACH H (2019): Die BRAF-Variante V595E in zytologischen Ausstrichen und Biopsien – ein neues diagnostisches Tool für das kanine Prostatakarzinom. 27. Jahrestagung der Fachgruppe „Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik“ der DVG (InnLab); 01.-02.02.2019 in München. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere. 2: 140.

GRASSINGER JM, MERZ S, PANTKE P, KEMPKER L, ERHARD H, AUPPERLE-LELLBACH H (2019): Die BRAF-Variante V595E im kaninen Prostatakarzinom. 162. Tagung und 23. Schnittseminar der DVG – Fachgruppe Pathologie; 01.-03.03.2019 in Fulda. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere. 3: 213.

GRASSINGER JM, Merz S, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, KLOPFLEISCH R (2019): Correlation of BRAF Variant V595E, Breed, Histological Grade and Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Transitional Cell Carcinomas. Veterinary Sciences. 6. pii: E31.

GRASSINGER JM, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, MERZ S, KLOPFLEISCH R (2019): Nachweis der BRAF-Mutation bei kaninen Prostataerkrankungen. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere. 47: 313–320.

AUPPERLE-LELLBACH H, KEHL A, MERZ S, GRASSINGER J, HOHLOCH C, PANTKE P (2019): Die BRAF-Mutation V595E im Übergangszellkarzinom – Untersuchungen zur Rassedisposition bei Terriern. Kleintiermedizin. 1: 30–33.

AUPPERLE-LELLBACH H, KEHL A, GRASSINGER J, MERZ S, PANTKE P (2019): BRAF-Mutation bei Karzinomen von Niere, Harnblase, Urethra und Prostata des Hundes. Frankfurter Kreis; am 19.01.2019 in Bad Kissingen.

WEBER C, PANTKE P, GRASSINGER J, ERHARD H, KLOPFLEISCH R, CIAN F, AUPPERLE-LELLBACH H (2019): Correlation between BRAF variant V595 and histological grade in canine transitional cell carcinoma. BSAVA Congress; 04.-07.04.2019 in Birmingham, England; Proceedings: 454–455.

AUPPERLE-LELLBACH H, GRASSINGER J, ERHARD H, KEMPKER L, MERZ S, PANTKE P (2019): BRAF-mutation in carcinomas of various sites in the canine urinary tract. 29th ECVIM Congress; 19.-21.09.2019 in Mailand, Italien; Congress abstracts: 267.

AUPPERLE-LELLBACH H, GRASSINGER JM, KEHL A, ERHARD H, KLOPFLEISCH R (2019): Anwendungsbeispiele des BRAF-Mutationsnachweises bei Übergangsepithel- und Prostatakarzinomen des Hundes. bpt-Kongress; 17.-19.10.2019 in München; Tagungsband: 87–90.

GRASSINGER JM, MERZ S, AUPPERLE-LELLBACH H, ERHARD H, KLOPFLEISCH R (2019): Die Korrelation der BRAF-Mutation, der histologischen Befunde und der Cyclooxygenase-2 Expression im Harnblasenkarzinom des Hundes. DVG-DGK-Kongress; 14.-17.11.2018 in Berlin; Tagungsband: 249–252.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klopffleisch möchte ich für die Möglichkeit der Dissertation sowie die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit, das Lesen aller Publikationsentwürfe und die fachlichen Ratschläge herzlich danken.

Frau Dr. Müller hat mir die Möglichkeit gegeben, meine Dissertation bei LABOKLIN anzufertigen. Auch dafür möchte ich mich bedanken.

Ein riesiges Dankeschön gilt Frau PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach. Liebe Heike, du bist mit mir den Weg bis zur Dissertation gegangen. Dabei standest du mir immer mit Rat und Tat zur Seite, warst sogar am Wochenende für mich erreichbar und, auch wenn es nicht immer leicht war, wirklich die beste Betreuung, die ich mir hätte wünschen können. Nicht umsonst wirst du von meiner „echten“ Familie als meine Wissenschafts-Mama bezeichnet.

Frau PD Dr. Rachel Maschang, Doreen Girndt und natürlich meinem lieben Onkel Winfried danke ich für die sprachliche Unterstützung.

Ein weiteres Dankeschön gilt dem Labor und allen Kolleginnen und Kollegen der Pathologie und Molekularbiologie bei Laboklin. So manches Mal kam ich mit fragendem Gesicht ins Labor oder in eines der Büros auf der Suche nach Sachen oder Antworten. Immer wurde ich mit einem Lächeln empfangen und ging meist wieder ein kleines Stückchen schlauer. Deshalb danke für eure Hilfe!

Außerdem möchte ich mich beim ganzen Blutlabor und hier vor allem bei meinen Mädels bedanken! Ihr habt nicht nur einmal über einen meiner Entwürfe gelesen und mir aus geistigen Sackgassen – sei es durch ein Stück Schokolade oder einfach durch ein kurzes, nettes Gespräch – geholfen. So manch netter Abend hat in der arbeitsreichen Zeit für Abwechslung gesorgt und sie so auch zu einer unvergesslichen Zeit gemacht. Vielen Dank für eure Freundschaft!

Und last but not least möchte ich meiner ganzen Familie und Silvio danken. Ihr habt mir erst das Studium ermöglicht und mich dann auch in der Dissertationszeit unterstützt und begleitet. Ihr seid immer für mich da und musstet so manches Wochenende entweder ganz auf meine Anwesenheit verzichten oder nur mit der physischen auskommen. Danke euch!

10. Erklärung zu Interessenskonflikten

Ich, Julia Maria Grassinger, arbeite bei der Firma LABOKLIN GmbH & Co. KG, die die Untersuchung auf die BRAF-Variante V595E kommerziell anbietet. Ein Interessenskonflikt besteht nicht.

11. Selbstständigkeitserklärung

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

Bad Kissingen, den 03.06.20

Julia Maria Grassinger

