

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

**Etablierung der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse
polymorpher Mikrosatelliten des Androgenrezeptor-Gens für
den Klonalitätsnachweis verschiedener kaniner und feliner
Tumoren aus archiviertem Material**

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

vorgelegt von
Nadine Maria Farwick, geb. Delcour
Tierärztin aus Münster

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4221

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

**Etablierung der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse
polymorpher Mikrosatelliten des Androgenrezeptor-Gens für den Klonalitätsnachweis
verschiedener kaniner und feliner Tumoren aus archiviertem Material**

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

vorgelegt von
Nadine Maria Farwick, geb. Delcour
Tierärztin aus Münster

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4221

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber
Zweiter Gutachter: PD Dr. Soroush Sharbati
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Mahtab Bahramsoltani

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cats, dogs, neoplasms, androgens, receptors, microsatellites, simple sequence repeats,
X chromosome, histiocytosis

Tag der Promotion: 09.03.2021

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	VII
ABBILDUNGEN.....	VIII
HINWEIS ZU LITERATURZITIERUNGEN	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATUR	4
2.1 Molekularbiologische Grundlagen.....	4
2.1.1 Das Mehrstufenkonzept der Tumorevolution.....	4
2.1.2 Tumorheterogenität.....	5
2.1.2.1 Das Tumorstammzell-Modell.....	6
2.1.2.2 Das Konzept der Feldkanzerisierung.....	7
2.1.2.3 Bedeutung der Tumorheterogenität für Diagnostik und Therapie.....	8
2.1.3 Die Lyon-Hypothese	8
2.1.3.1 Molekularer Mechanismus der Lyonisierung.....	9
2.1.3.2 Methylierungsabnormitäten der DNA.....	10
2.1.4 Die X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse	12
2.1.4.1 Das Androgenrezeptor-Gen	15
2.1.4.2 Restriktionsendonukleasen	16
2.1.4.3 Extraktion von DNA aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben.....	17
2.2 Kanine kutane Histiozytome - klinisch-diagnostische Grundlagen.....	18
2.3 Ziele und Hypothesen dieser Arbeit	20
3 EIGENE PUBLIKATIONEN IN WISSENSCHAFTLICHEN FACHZEITSCHRIFTEN	21
3.1 <i>Canine cutaneous histiocytomas are clonal lesions as defined by X-linked clonality testing.....</i>	<i>21</i>
3.2 <i>Microsatellites within the feline androgen receptor are suitable for X chromosome-linked clonality testing in archival material.....</i>	<i>29</i>

4	DISKUSSION	37
4.1	Erste Hypothese	37
4.1.1	Fehlerquellen der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse	37
4.1.1.1	Ursachen für falsch monoklonale Inaktivierungsmuster	38
4.1.1.1.1	Pseudomonoklonalität.....	38
4.1.1.1.2	<i>Patch-size</i> -Phänomen.....	38
4.1.1.1.3	Methylierungsabnormitäten der X-Chromosomen	39
4.1.1.1.4	Technisch-methodischer Fehler	40
4.1.1.2	Ursachen für falsch polyklonale Inaktivierungsmuster	41
4.1.1.2.1	Verunreinigung der Probe mit nicht neoplastischen Zellen.....	41
4.1.1.2.2	Tumor-Hypomethylierung oder -Hypermethylierung.....	41
4.1.1.2.3	Technisch-methodischer Fehler	41
4.1.2	Beurteilung der Klonalität von Histozytomen in der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse	42
4.2	Zweite Hypothese	44
4.3	Dritte Hypothese	46
4.4	Vierte Hypothese	48
4.5	Qualitätsprüfung der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse als diagnostischer Test.....	49
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	50
5	ZUSAMMENFASSUNG	52
6	SUMMERY	54
7	LITERATURVERZEICHNIS	56
8	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	71
9	DANKSAGUNG	72
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	73

ABKÜRZUNGEN

A	A denin
AR	A ndrogenrezeptor
C	C ytosin
CAG	Basenfolge C ytosin - A denin - G uanin
CANARA	C aniner A ndrogenrezeptor A ssay
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> / Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
c-Kit	Tyrosinkinase KIT , Genprodukt des Protoonkogens <i>c-kit</i>
CpG	5'- C -Phosphat- G -3'; lineare Cytosin - Guanin Sequenz
CSC	C ancer S tem C ell / Tumorstammzelle
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
FELARA	F eliner A ndrogenrezeptor A ssay
FeLV	F elines L eukämie- V irus
FFPE	F ormalin- f ixiert und P araffin- e ingebettet
G	G uanin
GGC	Basenfolge G uanin - G uanin - C ytosin
G6PD	G lukose- 6 - P hosphat- D ehydrogenase
<i>HhaI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus haemolyticus</i> , I. Enzym
<i>HpaII</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , II. Enzym
HUMARA	H umaner A ndrogenrezeptor A ssay
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> / neuartige genanalytische Verfahren
NTRK	N eurotrophe T yrosin- R ezeptor K inase
PAGE	P olyacrylamid- G eleelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Polymerase-Kettenreaktion
p53	Tumorsuppressor, Zellzyklusregulator
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
SLIT	sezerniertes Protein der extrazellulären Matrix / Signalprotein
SLITRK4	<i>SLIT and NTRK like family member 4</i> / integrales Membranprotein
TCA	<i>Transcriptional Clonality Assay</i> / quantitative Analyse der Genexpression
T	T hymine
TNF	T umornekrosefaktor
XCIMA	X - C hromosom- I naktivierungsmuster- A nalyse
<i>Xist</i>	<i>X-inactive specific transcript</i> / RNA, die bei der X-Inaktivierung an das betroffene X-Chromosom bindet

ABBILDUNGEN

Abbildung 1	Schematische Darstellung der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse.....	13
Abbildung 2	Verdau mit <i>Hpa</i> II eines Gens, für das das Individuum heterozygot ist: Unterschied zwischen normalen Zellen und Tumorzellen.....	14

HINWEIS ZU LITERATURZITIERUNGEN

In der vorliegenden Arbeit wird nach den aktuellen American Psychological Association (APA) - Zitierregeln für wissenschaftliche Arbeiten zitiert (American Psychological Association, 2020).

Zusätzliche Erläuterungen zu den Quellenangaben:

Quellenangaben, die nur für den vorangegangenen Satz gelten, werden vor das Satzzeichen geschrieben. Quellenangaben, die für einen gesamten Absatz gelten, werden hinter das Satzzeichen des letzten Satzes des Absatzes geschrieben.

1 EINLEITUNG

Jeder Organismus stellt eine Gemeinschaft von Zellen dar. Bei dieser Zellgemeinschaft handelt es sich bei den einzelnen Zellverbänden um Spezialisten in arbeitsteiligen Gesellschaften. Die Erledigung von Aufgaben und das Einhalten von Regeln werden durch die Regulation der Genexpression erfüllt. Kommt es infolge genetischer oder epigenetischer Veränderungen in einer oder mehreren somatischen Zellen zum Verlust von Regeln oder zum Nichteinhalten von Aufgaben, so kann eine benigne oder maligne Neoplasie (im folgenden „Tumor“ genannt) entstehen. Dabei entsteht die typische Tumorzelle schrittweise in einem „Mikroevolutionsprozess“, der über Jahre zu einer Akkumulation von fünf bis zehn kritischen Veränderungen in einer spezifischen Zelle führt. Diese Veränderungen treffen hauptsächlich Gene für Zellteilungsregulation, Apoptoseregulation und Desoxyribonukleinsäure (engl. *Deoxyribonucleic acid* / DNA) - Reparatur. Es kommt zu einem Verlust weiterer Regeln und somit zu einem weiteren Selektionsvorteil der betroffenen Zelle, bis ein „gesetzloser“ Zellklon entsteht, der im Fall einer malignen Neoplasie den Gesamtorganismus gefährdet. (Helmberg, 2000 - 2019)

Die Hypothese, dass Tumoren klonale Proliferationen sind, die aus einer einzigen neoplastisch transformierten Zelle hervorgehen, wurde zum Basisprinzip der Onkologie (Nowell, 1976; Garcia et al., 2000; Marusyk & Polyak, 2010). Obwohl es einige Ausnahmen dieser Regel gibt (Going, 2003; Kisseberth & Sandgren, 2004; Parsons, 2008 & 2018), wurde seit Beginn der 1980er Jahre die Untersuchung von Tumoren auf Klonalität zu einer wichtigen, ergänzenden Technik in der humanen Krebsdiagnostik (Leedham & Wright, 2008). Die Klonalitätsanalyse kommt auch heute noch häufig zur Anwendung, vor allem bei histologisch schwierig zu differenzierenden Geweben, wie z. B. lymphatischen Neoplasien und Hyperplasien (Diaz-Cano et al., 2001; Jevremovic & Viswanatha, 2009; Gazzola et al., 2014).

Auch in der Veterinärmedizin wurden zahlreiche Techniken zur Klonalitätsanalyse entwickelt, z. B. das Southern-Blot-Hybridisierungsverfahren (Levesque et al., 1990; Momoi et al., 1993; Ishiguro et al., 1994 a, b) und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für den Nachweis klonal rekombinierter Antigenrezeptor-Gene (Vernau & Moore, 1999; Burnett et al., 2003; Moore et al., 2005; Werner et al., 2005; Henrich et al., 2009; Weiss et al., 2011 b). Weitere Techniken zielten auf die Demonstration der klonalen Integration des feline Leukämievirus (FeLV) - Provirus in das Wirtsgenom (Casey et al., 1981), die Demonstration von Mutationen im c-Kit-Gen (Zavodovskaya et al., 2004), die Demonstration von klonalen Polymorphismen in Mitochondrien-DNA (Bertagnolli et al., 2009) und die Demonstration der Klonalität durch Analysen von Mikrosatelliten und Mitochondrien-DNA im Stickersarkom (Murgia et al., 2006).

1995 entwickelten Wagner et al. ein Assay, das das X-Chromosom-Inaktivierungsmuster des Androgenrezeptor (AR) - Gens von kaninen hämatopoetischen Stammzellen nach Knochenmarktransplantation untersuchte. Mochizuki et al. (2012) wandten die X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse des AR-Gens zur Klonalitätsanalyse von Tumoren jedoch erstmalig 2012 bei Katzen an. Bis dahin gab es in der Veterinärmedizin keine Assays, die die Klonalität feliner nicht lymphoider Tumoren evaluierten (Mochizuki et al., 2012). Bei Hunden wurde ein derartiges Assay zur Klonalitätsanalyse von Tumoren bis *dato* ebenfalls nicht beschrieben.

In der englischsprachigen Literatur wird für die Analyse der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster häufig der Begriff „*XCIP analysis*“ (*X-chromosome inactivation pattern analysis*) genutzt (Mochizuki et al., 2012 & 2015; Mossner et al., 2013; Tomita et al., 2019). In der deutschsprachigen Literatur gibt es noch keinen feststehenden Begriff für diese Art von Klonalitätsanalysen. Analog dem englischen Begriff soll diese Analyse in der vorliegenden Arbeit daher X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse (XCIMA) genannt werden.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine kumulative Dissertation, die auf zwei Publikationen beruht. Beide Texte wurden in englischsprachigen, internationalen Fachzeitschriften mit Gutachtersystem publiziert. Ziel und Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung zweier XCIMA für die Anwendung bei kaninen bzw. felinen Tumoren aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem (FFPE) - Material. Zur Gewinnung erster Anhaltspunkte zur Funktionalität dieser Analysen bei soliden Tumoren aus archiviertem Material sollen verschiedene, bereits in anderen Studien eindeutig diagnostizierte Tumoren der XCIMA unterzogen werden. Insbesondere soll mit dem für Hunde entwickelten Assay die Hypothese „Das kanine kutane Histiozytom hat einen monoklonalen Ursprung und stellt damit einen „echten“ Tumor dar.“ geprüft werden. Kanine kutane Histiozytome sind häufig schwierig von reaktiven Formen histiozytärer Erkrankungen zu differenzieren. Es soll geprüft werden, ob die XCIMA hier ein hilfreiches Diagnostikum sein kann. Zudem sollen Mikrosatelliten im felinen AR-Gen näher untersucht und ihre Anwendbarkeit in der XCIMA an Lymphomen aus FFPE-Material getestet werden.

Grundlage der XCIMA ist die Lyon-Hypothese, welche besagt, dass in jeder weiblichen Zelle eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert vorliegt. Die Inaktivierung eines X-Chromosoms manifestiert sich in der frühen Embryonalzeit. Sie erfolgt in jeder Zelle nach dem Zufallsprinzip und wird dann an alle Tochterzellen stabil weitergegeben. Ein normales Gewebe stellt somit ein Mosaik aus Zellen mit jeweils unterschiedlich inaktivierten X-Chromosomen dar. Bei einem Tumor liegt aufgrund seiner Klonalität in jeder Zelle das gleiche X-Chromosom inaktiviert vor. Diese Abweichung vom normalen Inaktivierungsmuster wird mit der XCIMA nachgewiesen. Dabei werden bestimmte X-chromosomal gebundene Gene weiblicher Individuen untersucht, für die die Individuen heterozygot sind. In der vorliegenden Arbeit sollen

polymorphe Sequenzen des kaninen und des felinen AR-Gens als Zielsequenzen für die jeweilige XCIMA verwendet werden.

Klonalitätsanalysen waren und sind in der Medizin von großem Nutzen. Sie können nicht nur dazu beitragen, Tumoren von reaktiven Proliferationsformen zu unterscheiden, sondern wurden beispielsweise auch dazu genutzt, phylogenetische Bäume wie die hämatopoetische Hierarchie aufzuzeigen oder Gatekeeper-Mutationen zu identifizieren (Chen & Prchal, 2007; Leedham & Wright, 2008; Swierczek et al., 2012). Ein spezieller Vorteil der XCIMA gegenüber anderen Klonalitätsanalysen ist, dass sie ohne Kenntnis eines tumorspezifischen, genetischen Markers den Nachweis der Klonalität erbringen kann (Mochizuki et al., 2015). Sie ist damit unabhängig von der Tumordiagnose und im Prinzip universell auf jede Art von Tumor anwendbar. Die Anwendbarkeit der XCIMA beschränkt sich jedoch ausschließlich auf weibliche Individuen, die in Bezug auf die zu untersuchenden Gene heterozygot sind.

2 LITERATUR

2.1 Molekularbiologische Grundlagen

Die meisten Tumoren entwickeln sich aus einer Ursprungszelle, die sich durch klonale Evolution stufenweise zu einem Tumor entwickelt. Diese Theorie der klonalen Evolution aus einer Ursprungszelle wurde bereits 1976 von Nowell entwickelt und bildet noch heute eine vorherrschende Lehrmeinung zur Krebsentstehung (Wagener & Müller, 2010; Parsons, 2018). Studien der letzten Jahre konnten demonstrieren, dass es neben den hauptsächlich in der Literatur beschriebenen monoklonalen Tumoren weitere Tumoren gibt, die sich aus mehreren Zellen entwickeln, also eine multiklonale Genese haben (Paiss et al., 2002; Kisseberth & Sandgren, 2004; Furlan et al., 2003; Cheng et al., 2008 b; Parsons, 2008).

Unabhängig vom mono- oder multiklonalen Ursprung eines Tumors wird die Tumorevolution als Mehrstufenkonzept für beide Tumorarten anerkannt (Guo et al., 2006).

2.1.1 Das Mehrstufenkonzept der Tumorevolution

1990 beschrieben Fearon und Vogelstein detailliert einen zum malignen Tumor (Malignom) führenden, mehrstufigen Prozess auf molekularer Ebene. Dieses Mehrstufenkonzept wurde am Beispiel des menschlichen Kolonkarzinoms und dessen Vorläuferläsionen entwickelt. Es sieht die Entstehung dieses Malignoms als einen sich über mehrere Jahre hinziehenden Mutations- und Selektionsprozess (Helmberg, 2000 - 2019).

Das Fearon-Vogelstein-Modell basiert auf drei wichtigen Phasen der malignen neoplastischen Transformation: Initiation, Promotion und Progression. Die Initiation stellt den ersten Schritt der Karzinogenese dar, bei dem eine Zelle eine von einem Karzinogen ausgelöste Mutation erfährt. Infolge struktureller Aberrationen, Genamplifikationen und Punktmutationen kann es zu einer unkontrollierten „onkogenen“ Aktivierung von Protoonkogenen kommen. Durch genetische Verluste zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist wahrscheinlich bei der Tumorentstehung und -entartung von noch entscheidenderer Bedeutung als die Aktivierung von Onkogenen. (Park & Simon, 2004) Wird nun eine solche Mutation nicht durch die zelleigene DNA-Reparatur behoben oder die Zelle nicht durch Apoptose ausgeschaltet, persistiert die Mutation und ist irreversibel (Stricker & Kumar, 2010). In der Initiationsphase erwirbt die betroffene Zelle das Potential zur klonalen Expansion (Park & Simon, 2004).

In der folgenden Latenzperiode ist die initiierte Zelle durch Proliferationsreize beeinflussbar. Diese Beeinflussbarkeit wird als Promotion bezeichnet und stellt den zweiten Schritt der Karzinogenese dar (Park & Simon, 2004). Die initiierte Zelle wird durch Wachstumsreize vermehrt und gibt ihren DNA-Schaden an die Tochterzellen weiter. Das Risiko für weitere Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen steigt, da durch den DNA-Schaden die DNA instabil geworden ist (Stricker & Kumar, 2010). Bei jeder weiteren Zellproliferation steigt das Risiko für neue Mutationen. Mit jedem weiteren Mutationsereignis vergrößert sich der Selektionsvorteil und verkleinert sich der Differenzierungsgrad des driftenden Zellklons (Helmborg, 2000 - 2019). Während der Promotionsphase erfolgt die klonale Selektion. Ein weiteres Phänomen tritt in dieser Phase auf, die sog. Immortalisierung, das „Unsterblich-Werden“ von Zellen. Ursache der Immortalisierung ist vermutlich die Heraufregulation der Telomeraseexpression in Tumoren infolge epigenetischer Veränderungen (Promotorhypomethylierung; Park & Simon, 2004). Somit können sich immortalisierte Zellen beliebig häufig teilen (Stricker & Kumar, 2010). Die Promotion ist in den frühen Phasen reversibel und hängt vor allem von der Anzahl der bereits initiierten Zellen ab (Park & Simon, 2004).

Die letzte Phase der malignen neoplastischen Transformation ist die Progression, welche irreversibel ist. In der Progressionsphase manifestieren sich genomische Alterationen und es kommt zur Formation eines malignen Tumors (Stricker & Kumar, 2010). Der Tumor sammelt weitere Mutationsereignisse, die z. B. für Metastasierungsorte oder Metastasierungsgeschwindigkeit von Bedeutung sind und spaltet sich in genetisch unterschiedliche Subklone auf (Helmborg, 2000 - 2019).

2.1.2 Tumorheterogenität

Ein maligner Tumor besteht aus Zellen, die eine unterschiedliche Gestalt, Kerngröße und Kernform aufweisen und häufig finden sich im Tumorgewebe Areale unterschiedlicher Histomorphologie. Neben diesem unterschiedlichen Phänotyp liegt dem Tumor auch ein unterschiedlicher Genotyp zugrunde. (Müllauer, 2017)

Die Technologien neuartiger genanalytischer Verfahren (*Next Generation Sequencing*, NGS) ermöglichten eine umfassende genetische Charakterisierung tausender Tumore verschiedener Entitäten sowie die Erforschung der Heterogenität in einem Tumor. Gerlinger et al. (2012 & 2014) untersuchten mittels Exomsequenzierung DNA-Mutationen in verschiedenen Arealen von Nierenzellkarzinomen und stellten heraus, dass 63 - 69 % aller Mutationen nicht in allen Regionen eines Tumors vorhanden sind. Auf diesen Ergebnissen basierend, entwickelten sie einen Evolutionsbaum der Genmutationen. Danach liegt in einem reifen Tumor ein dominanter Zellklon mit einem Stamm an Mutationen vor, der sich in verschiedene Subklone

mit zusätzlichen Mutationen aufzweigt. Wang et al. (2014) fanden bei der Untersuchung von Karzinomen eine hohe Anzahl an subklonalen und *De-novo*-Mutationen, die jeweils in nur einer Zelle vorkamen. Sie schlossen daraus, dass große chromosomale Rearrangements (sog. Treiber-Mutationen) früh in der Tumorevolution auftreten, damit meist in allen Abschnitten eines Primärtumors und den Metastasen vorkommen und Punktmutationen kontinuierlich über einen langen Zeitraum entstehen. (Müllauer, 2017)

2.1.2.1 Das Tumorstammzell-Modell

Die Entstehung eines Tumors aus einer Ursprungszelle stellt nach dem Mehrstufenkonzept ein Ereignis dar, das unter Umständen mehrere Jahre in Anspruch nimmt. Das setzt voraus, dass die Ursprungszelle, die den schädigenden Einflüssen ausgesetzt war, über Jahre im Organismus verweilt. Eine so lange Überlebensdauer trifft fast nur auf Stammzellen zu. (Wagner & Müller, 2010)

Bereits im 19. Jahrhundert beschrieben Virchow und Conheim Tumorzellen, die embryonalen Stammzellen ähnelten. Bonnet und Dick fanden 1997 den ersten Beweis für Tumorstammzellen (*cancer stem cell* / CSC) in hämatopoetischen Neoplasien, indem sie im Mäusemodell herausfanden, dass nur ganz bestimmte Zellen eines Tumors nach Transplantation einen Tumor auslösen konnten. Mittlerweile konnten CSC auch in soliden Neoplasien von Brust, Lunge, Ovar, Prostata, Magen, Darm, Gehirn und Pankreas identifiziert werden (Costa et al., 2007; Li et al., 2007).

Eine CSC wird definiert als eine Zelle innerhalb eines Tumors, die die Fähigkeit besitzt, sich selbst zu erneuern und zudem heterogene Tumorzelllinien zu generieren, die die Tumormasse bilden (Clarke et al., 2006). Damit gleicht sie dem Verhalten einer normalen Stammzelle in Bezug auf deren asymmetrische Teilung (van Niekerk et al., 2017).

Es wird angenommen, dass eine Tumorstammzelle von einer normalen Stammzelle oder einer Vorläuferzelle abstammt, in der Mutationen oder epigenetische Veränderungen akkumuliert wurden und zur Initiation und Progression führten. Eine andere Theorie zur Entstehung der CSC ist, dass sehr kleine, embryonale, Stammzell-ähnliche Zellen, die zur falschen Zeit mobilisiert und deplatziert wurden, sich zu CSC entwickeln können. Auch Mutationen in anderen bereits differenzierteren Zellen könnten die Transformation in eine CSC auslösen, da veränderte differenzierte Zellen ihre spezifischen Eigenschaften verlieren und ihr Potential zur Selbsterneuerung wiedererlangen können. (Gil et al., 2008)

Das Tumorstammzell-Konzept wird im Allgemeinen als ein Konzept der monoklonalen Tumorentstehung verstanden (Parsons, 2018). Parsons stellt jedoch die Hypothese auf, dass eine multiklonale Tumorgenese möglich wäre, wenn eine Interaktion mehrerer pluripotenter Stammzellen die Tumor-Initiation induzieren würde.

2.1.2.2 Das Konzept der Feldkanzerisierung

Viele Studien zeigten, dass bereits präneoplastische Läsionen polyklonal sind (Winton et al., 1989; Merrit et al., 1997; Going et al., 2001; Kisseberth & Sandgren, 2004). Daraus folgerte man, dass diesen Läsionen multiklonale Ursprünge zugrunde liegen (Parsons, 2018; Kisseberth & Sandgren, 2004; Hügel & Wernert, 1999; Diaz-Cano et al., 2001).

Das Konzept der multi- oder polyklonalen Tumorentstehung beruht auf der sog. Feldkanzerisierung als frühestem Stadium der Tumorgenese (Parsons, 2018). Verschiedene ätiologische Faktoren (z. B. Lebensgewohnheiten, Ernährung, Hormone und genetische Faktoren) und ihre Interaktionen untereinander können dazu beitragen, dass ein Gewebeumfeld entsteht, das ein „Feld der Anfälligkeit“ gegenüber neoplastischer Initiation, Promotion und Progression bildet (Lochhead et al., 2015). In der Feldkanzerisierung erwerben mehrere Stammzellen, die in enger Nachbarschaft liegen, somatische Mutationen und entwickeln sich zu Zellclustern mit genetisch veränderten (initiierten) Zellen. Neben gemeinsamen Genmutationen weisen die Zellen eines Clusters auch abnorme epigenetische Veränderungen auf, wie z. B. eine klonale X-Chromosom-Inaktivierung. Die initiierten Zellen eines Clusters sind empfänglicher gegenüber Karzinogenen und maligner Transformation. Aus einigen dieser initiierten Zellen kann sich schließlich ein multifokaler Tumor mit multiklonalem Ursprung entwickeln. (Cheng, 2008 a)

Viele Autoren wie Fialkow et al. (1977) oder Vogelstein et al. (1985) sahen spontane somatische Mutationen als seltene Ereignisse an und begründeten damit das Konzept der monoklonalen Tumorentstehung. Neuere Studien (z. B. Sudo et al., 2006; Jenkins et al., 2003) die die Mutationsfrequenz spezifischer Onkogene und Tumorsuppressorgene in gesundem Gewebe *in vivo* untersuchten, verzeichneten jedoch eine deutlich höhere Mutationsfrequenz dieser Gene als bisher bei *in vitro* Studien (z. B. Oller et al., 1989; Chu et al., 1988) der Mutationsfrequenz von neutralen Reportergenen ermittelt wurde (Parsons, 2008). Parsons (2008 & 2018) sieht darin eine höhere Wahrscheinlichkeit begründet, dass in mehreren Zellen gleichzeitig Tumor-assoziierte Mutationen auftreten können und stützt damit das Konzept der multiklonalen Tumorentstehung.

Graham et al. (2011) begründen die Feldkanzerisierung als Ursache der multiklonalen Tumorentstehung mit der Hypothese, dass ein mutierter epithelialer Klon durch veränderte Signalwege das umgebene Stroma verändert und dieses wiederum die Mutagenese des umgebenden Epithels anregt. Auch Soto und Sonnenschein (2011) sehen abnorme Interaktionen zwischen Stroma und Parenchym als Basis der Feldkanzerisierung an.

2.1.2.3 Bedeutung der Tumorerogenität für Diagnostik und Therapie

In Tumoren monoklonalen Ursprungs ist die initiiierende molekulare Läsion in allen Tumorzellen vorhanden, während in Tumoren multiklonalen Ursprungs verschiedene initiiierende Onkogen- und Tumorsuppressorgen-Mutationen in Subpopulationen innerhalb der Tumorzellpopulation vorhanden sind (Parsons, 2008). Damit entwickelt sich die Tumorerogenität bei einem monoklonalen Tumor im Zuge seiner klonalen Evolution und liegt im Gegensatz dazu in Tumoren multiklonalen Ursprungs von Beginn an vor.

Müllauer (2017) sieht die genetische Heterogenität von Tumoren als eine Ursache für die Entwicklung einer Therapieresistenz. Resistenzmutationen sind häufig schon vor Therapie in kleinen Subklonen vorhanden und werden unter Therapie selektiert. Parsons (2008) sieht diese Entwicklung einer Therapieresistenz vor allem für multiklonale Tumoren gegeben. Während bei monoklonalen Tumoren die initiiierende Läsion ein gutes Target für die Chemotherapie darstellt, welche damit alle Tumorzellen erreicht, kann es bei multiklonalen Tumoren vorkommen, dass kleine, nicht entdeckte Subpopulationen nicht vom Chemotherapeutikum abgedeckt werden und zu einem Rezidiv führen. Für die Diagnostik und Therapie bedeutet das, dass in vielen verschiedenen Tumorebenen mögliche molekulare Angriffspunkte für die Therapie gesammelt und ausgewertet werden müssen, bevor eine gezielte, kombinierte Therapie eingesetzt werden kann (Parsons, 2008). Insbesondere trifft dies bei Tumoren mit multiklonalem Ursprung zu, da ihr Arsenal an möglichen Mutationen vermutlich größer ist als bei Tumoren mit monoklonalem Ursprung. Auch Helmborg (2000 – 2019) sieht als Ziel aller Tumordiagnostik die Bestimmung eines individuellen „Tumormutationsprofils“, welches dann die Verabreichung einer sinnvollen Therapie (*personalized medicine*) ermöglicht.

Klonalitätsanalysen liefern einen wertvollen Beitrag zur Identifikation der Tumorerogenität und damit zur Bestimmung des individuellen Tumormutationsprofils. Allerdings sehen Keller et al. (2016) die Heterogenität in einem Tumor als Herausforderung bei der Interpretation von Klonalitätsanalysen, so dass Tumordiagnostik immer eine Kombination aus klinischer, morphologischer und immunphänotypischer Untersuchungen darstellt, deren Ergebnisse von Klonalitätsanalysen gestützt werden können.

2.1.3 Die Lyon-Hypothese

Frühe Arbeiten aus den 1960er Jahren bilden die Grundlage für die Lyon-Hypothese, welche besagt, dass in weiblichen somatischen Zellen immer nur eines der beiden X-Chromosomen aktiv vorliegt und das andere inaktiviert ist (Park & Simon, 2004). Durch diese X-Chromosom-Inaktivierung wird in weiblichen Zellen die gleiche Gendosis X-chromosomal gebundener Gene erreicht wie in den Zellen männlicher Organismen, die nur ein X-

Chromosom besitzen. Diese Inaktivierung erfolgt zu einem sehr frühen embryonalen Zeitpunkt. In jeder embryonalen Zelle wird nach dem Zufallsprinzip bestimmt, ob das väterliche oder das mütterliche X-Chromosom inaktiviert wird. Theoretisch werden gleich viele väterliche wie mütterliche X-Chromosomen inaktiviert, so dass ein Verhältnis von 1:1 entsteht (Chen & Prchal, 2007).

Ein einmal inaktiviertes X-Chromosom bleibt durch epigenetische Regulation fortlaufend inaktiv und wird so von einer Zelle auf alle Tochterzellen weitergegeben. Damit besteht jedes weibliche ausdifferenzierte Gewebe aus einem Mosaik von Zellen, in denen jeweils unterschiedliche X-Chromosomen inaktiviert vorliegen. (Park & Simon 2004)

Bei der Stilllegung eines X-Chromosoms, der sog. „Lyonisierung“, handelt es sich um eine Regulation der Genexpression, nicht etwa um eine Änderung der DNA-Sequenz. Die X-Inaktivierung ist prinzipiell umkehrbar und wird in bestimmten Entwicklungsstadien der Keimbahn aufgehoben. In somatischen Zellen findet eine Aufhebung jedoch nicht statt. (Wikipedia Autoren, 2019, 25. Dezember)

2.1.3.1 Molekularer Mechanismus der Lyonisierung

Die Lyonisierung ist einem molekularen Prozess zuzuordnen, der zu einer monoallelen Expression von biallelen Genen führt. Dieser Prozess wird „Imprinting“ (genomische Prägung) genannt und vollzieht sich auf der Transkriptionsebene über allelspezifische DNA-Methylierung. Durch diese DNA-Methylierung kommt es zur Stilllegung des Gens (transkriptionelles Gen-Silencing).

Im Speziellen handelt es sich um eine Methylierung von Cytosinresten in Bereichen der linearen Basenfolge Cytosin - Guanin (CpG) in der DNA (Leeb & Wutz, 2012; Hörbe, 2005). CpG-Dinukleotide sind bezogen auf das Gesamtgenom eigentlich unterrepräsentiert. Allerdings kommen im Genom einzelne kleinere Regionen vor, die sehr viele CpG-Nukleotide enthalten, diese Regionen werden „CpG-Inseln“ genannt (Wagener & Müller, 2010). Sie sind mehr als 200 Basenpaare lang, bestehen zu mindestens 50% aus C- und G-Nukleotiden und liegen meist proximal von Promotorregionen. Ca. 60% der Promotoren menschlicher Gene sind mit derartigen CpG-Inseln assoziiert (Portela & Esteller, 2010). Diese CpG-Inseln vor Promotorregionen sind in den meisten normalen Zellen nicht methyliert, was bedeutet, dass das entsprechende Gen exprimiert wird. Im Rahmen der Lyonisierung werden diese CpG-Inseln jedoch methyliert und sind damit für die Inaktivierung der entsprechenden Gene verantwortlich (Wagener & Müller, 2010).

Neben den CpG-Inseln gibt es auch noch sog. CpG-Insel-Shores, die nah proximal der CpG-Inseln liegen und deren Methylierung ebenfalls für die Inaktivierung verantwortlich sein kann (Portela & Esteller, 2010).

2.1.3.2 Methylierungsabnormitäten der DNA

Die DNA-Methylierung ist ein Mechanismus zur Regulation von Genaktivitäten und zur Gestaltung des Entwicklungsprogramms eines Organismus (Arnemann, 2019). Veränderte Umweltbedingungen können beispielsweise über Signaltransduktion zu einem veränderten Methylierungsmuster der DNA in bestimmten Bereichen führen. Dadurch wird eine selektive Lesehäufigkeit des assoziierten Gens möglich (differenzielle Genexpression). Die Auswahl, welches Gen methyliert wird und welches nicht, hängt auch von der Aktivität des spezifischen Gens im Gewebe ab (Wikipedia Autoren, 2020, 20. März). DNA-Methylierungsmuster sind somit gewebespezifisch und variieren in verschiedenen Altersstufen (Christensen, 2009). Fehlerhafte DNA-Methylierungen können eine erhöhte oder eine erniedrigte Genaktivität bedingen und damit häufig Ursache für Krankheiten sein. (vgl. Wikipedia Autoren, 22. März 2020)

Methylierungsabnormitäten der DNA stehen oft in Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren. Jones und Baylin (2002) berichten darüber, dass einzelne CpG-Inseln in bestimmten Promoterregionen des Tumorgenoms häufig methyliert sind, wohingegen die Methylierung der DNA insgesamt im Tumorgenom vermindert ist. Diese Methylierungsabnormitäten treten während der malignen Transformation auf. Hypomethylierungen (von z. B. Onkogenen) finden sich hauptsächlich in frühen neoplastischen Stadien, während Hypermethylierungen (von z. B. Tumorsuppressorgenen) eher in späteren Stadien mit höherer Mutationsrate und Tumorprogression einhergehen (Diaz-Cano et al., 2001).

Die DNA-Methylierung ist auch für die Aufrechterhaltung des monoallelischen Silencing im Zusammenhang mit der Inaktivierung von X-Chromosomen entscheidend (Li et al., 1993). Normalerweise liegen in einem Gewebe in 50 % der Zellen das maternale und in den anderen 50 % der Zellen das paternale Allel eines Gens inaktiviert vor. Wenn jedoch in mehr als 75 % der Zellen dasselbe Allel (z. B. das paternale) inaktiviert vorliegt, spricht man von einem „verschobenen“ X-Chromosom-Methylierungsmuster (*skewed methylation*; Minks et al., 2008). Diese Abnormität des X-chromosomalen Methylierungsmusters kann angeboren oder erworben sein und findet sich v. a. in hämatopoetischen Zellen (Chen & Prchal, 2007).

Angeborene Ursachen für eine Methylierungsabnormität der X-Chromosomen können z. B. eine zufällig asymmetrische Teilung von embryonalen Stammzellen, Mutationen im *Xist* (*X-inactive specific transcript*) - Gen und vererbte Faktoren sein (Minks et al., 2008; Plenge et al., 1997). Carrel und Willard (2005) konnten zudem zeigen, dass in einem inaktivierten X-Chromosom nicht alle X-chromosomal gebundenen Gene komplett methyliert sind, so liegen 15 % nicht methyliert vor und weitere 10 % nur teilweise methyliert. Gale et al. (1994) stellten fest, dass auch X-chromosomale Methylierungsmuster gewebespezifisch sein können.

Zu den erworbenen Ursachen von X-chromosomalen Methylierungsabnormitäten zählt die Selektion infolge einer Mutation zugunsten des methylierten oder des nicht methylierten X-Chromosoms (Minks et al., 2008). Sich schnell teilende Zellen, wie z. B. hämatopoetische Zellen, zeigen daher die größten Abweichungen vom normalen Methylierungsmuster (Busque et al., 1996). Je länger die Zeitspanne ist, in der der Selektionsdruck vorliegt, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit für veränderte Methylierungsmuster. Daher treten die meisten erworbenen Methylierungsmusterabnormitäten erst in einem fortgeschrittenen Lebensalter auf (Busque et al., 1996; Minks et al., 2008). Durch eine Veränderung der Methylierung von Genen im Alter können X-Chromosom assoziierte Erkrankungen erst zu einem späten Zeitpunkt im Leben manifest werden (z. B. systemische Sklerose, autoimmune Schilddrüsenerkrankungen, primär biliäre Zirrhose; Chen & Prchal, 2007).

In der Humanmedizin konnte mittels XCIMA gezeigt werden, dass bei hämatopoetischen Zellen von 38 % gesunder Frauen im Alter über 60 zu mehr als 90 % das gleiche X-Chromosom inaktiviert vorliegt (Busque et al., 1996). Busque et al. (1996), Abkowitz et al. (1998) und Mannhalter und Mitterbauer (1998) vermuteten, dass dieses deutlich veränderte Methylierungsmuster auf der Depletion von hämatopoetischen Stammzellen im Alter, wahrer klonaler Hämatopoese (Myelodysplasie) oder auf somatischer Selektion beruhe. Swiercek et al. (2012) konnten in einer Studie jedoch herausstellen, dass der in der XCIMA des AR-Gens ermittelte Methylierungsstatus nicht immer den tatsächlichen Inaktivierungsstatus dieses Gens widerspiegelt und damit nicht immer die Expression des Gens reflektiert. Sie untersuchten ebenfalls das Phänomen der extremen Methylierungsabnormität des AR-Gens in hämatopoetischen Zellen einiger älterer Frauen allerdings mittels einer quantitativen Analyse der Genexpression (*Transcriptional Clonality Assay / TCA*) und stellten eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des TCA und denen der XCIMA heraus. Der TCA ergab in einigen Fällen keine monoallele Expression obwohl die XCIMA eine klonale Methylierung des AR-Gens zeigte. Daraus leiteten sie ab, dass das Methylierungsmuster des AR-Genlokus bei manchen Menschen heterogen ist und deren AR-Genlokus sowohl hypo- als auch hypermethyliert vorliegen kann. Sie erklärten ihre Ergebnisse damit, dass die in der XCIMA dargestellte CpG-Methylierung im Exon 1 des AR-Gens nicht in der Promoterregion des Gens liegt und es dadurch vorkommen kann, dass diese Methylierung nicht immer mit dem Gen-Silencing übereinstimmt. Dieses Phänomen sahen sie v. a. für granulozytäre Zellen gegeben. Swiercek et al. (2012) konnten des Weiteren zeigen, dass Patienten mit echter klonaler Hämatopoese sowohl bei der Untersuchung mittels TCA als auch mittels XCIMA übereinstimmende Ergebnisse zeigten. Daraus folgerten sie, dass eine klonale Hämatopoese bei älteren gesunden Patientinnen als Ursache für die o. g. Methylierungsabnormitäten nicht in Frage kommt, sondern es sich bei diesen Frauen um Individuen mit einem heterogen methylierten AR-Genlokus handelt.

In der Veterinärmedizin konnte bei älteren Katzen ein ähnliches, deutlich verschobenes X-Chromosom-Inaktivierungsmuster nachgewiesen werden (Abkowitz et al., 1998). In dieser Studie wurde jedoch nicht der Methylierungsstatus des AR-Gens analysiert, sondern es wurden Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) - Isoformen untersucht. Thompson et al. (2017) konnten für Hunde altersbedingte Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster feststellen, ein deutlich verändertes X-Chromosom-Inaktivierungsmuster wie beim Menschen oder bei der Katze wird bei älteren Hündinnen in der Literatur aber bislang nicht beschrieben.

2.1.4 Die X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse

Die Lyon-Hypothese sowie umfangreiche Untersuchungen zur X-Chromosom-Inaktivierung bilden die theoretische Grundlage für die X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse. In dieser Analyse wird das Inaktivierungs-/Methylierungsmuster von X-chromosomal gebundenen Gensequenzen weiblicher Individuen auf Klonalität untersucht. Im Falle eines Tumors kann mit dieser Methode die klonale Inaktivierung/Methylierung der untersuchten Genloki nachgewiesen werden (Mannhalter & Mitterbauer, 1998; Wainscoat & Fey, 1990). Eine unverzichtbare Voraussetzung für die XCIMA ist die Heterozygotie der Allele für einen leicht zu findenden Polymorphismus.

Zu Beginn der XCIMA wird der gewählte Genlokus auf Heterozygotie untersucht. Dafür werden die Allele in einer PCR amplifiziert und die PCR-Produkte in einem Gelelektrophorese-Verfahren anhand ihrer Größe aufgetrennt und identifiziert. Im Fall eines für das Gen heterozygoten Individuums trennen sich zwei PCR-Produkte im Gel auf. Die zwei Banden stehen für die beiden unterschiedlichen Allele des Gens. Im Fall eines für das Gen homozygoten Individuums trennt sich in der Gelelektrophorese nur ein PCR-Produkt auf, da auf beiden X-Chromosomen das gleiche Allel vorhanden ist. Homozygotie ist ein Ausschlusskriterium von der XCIMA.

Eines der beiden Allele auf den X-Chromosomen ist immer inaktiviert, also methyliert (Lyon-Hypothese). Bei einem normalen Zellverband liegt in jeder Zelle ein anderes Allel methyliert vor, bei manchen Zellen das väterliche, bei anderen das mütterliche Allel. Betrachtet man die Gesamtheit dieser Zellen, so findet man ein Mosaik aus methylierten väterlichen und methylierten mütterlichen Allelen, die bei Vorliegen von Heterozygotie unterschiedlich sind. Bei einem Tumor ist das anders. Aufgrund seiner Klonalität liegt in seinen Zellen immer das gleiche Allel methyliert vor, entweder das mütterliche oder das väterliche.

Diese klonale Methylierung eines Allels bei einem Tumor gilt es im nächsten Schritt nachzuweisen. Dazu werden methylierungssensitive Restriktionsendonukleasen (*HpaII* oder *HhaI*) für einen Verdau eingesetzt. Diese schneiden die DNA selektiv an nicht methylierten Stellen,

somit wird das aktive Allel zerschnitten, das inaktivierte, methylierte Allel bleibt erhalten. Nach dem Verdau kann dann nur das inaktivierte, nicht zerschnittene Allel des korrespondierenden Gens mittels PCR amplifiziert und in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Bei einem Tumor trennt sich nach dem Verdau in der Gelelektrophorese nur ein PCR-Produkt auf, entweder das methylierte mütterliche oder das methylierte väterliche Allel. Bei der Untersuchung von gesundem polyklonalem Gewebe hingegen trennen sich auch nach dem Verdau zwei PCR-Produkte in der Gelelektrophorese auf, das methylierte mütterliche und das methylierte väterliche Allel (Abbildung 1 und 2).

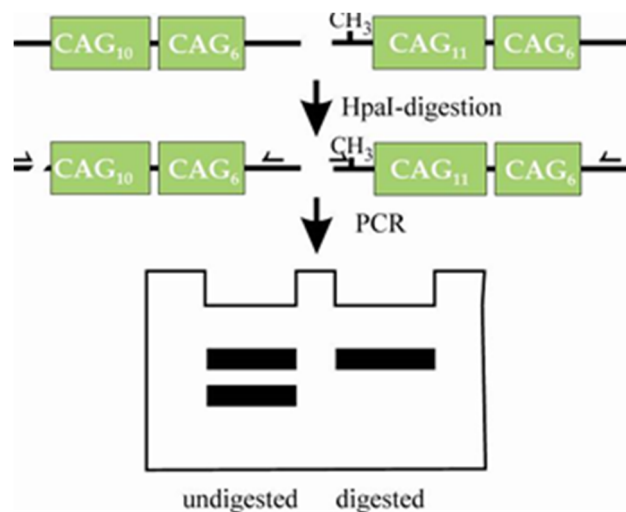


Abbildung 1 (Delcour et al., 2013): Schematische Darstellung der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse

Untersucht wird ein Tumor eines weiblichen Individuums, das heterozygot für einen Cytosin - Adenin - Guanin Polymorphismus ist. Aufgrund der Heterozygotie enthält die unverdaute Probe beide Allele, da sowohl das methylierte als auch das nicht methylierte Allel amplifiziert wurden. In der Gelelektrophorese trennen sich zwei Produkte der Polymerase-Kettenreaktion auf. Nach dem Verdau mit methylierungssensitiver Endonuklease trennt sich dagegen nur ein Produkt der Polymerase-Kettenreaktion auf, das methylierte Allel, welches bei allen Tumorzellen aufgrund deren Klonalität gleich ist.

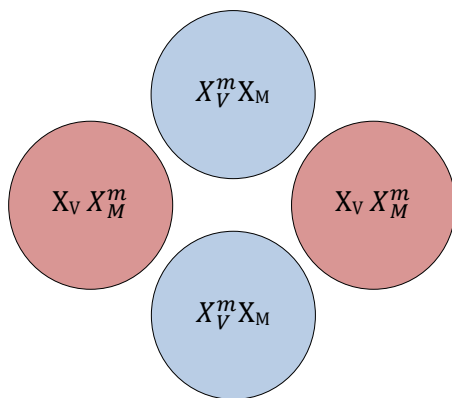
Abbildung 2: Verdau mit *Hpa*II eines Gens, für das das Individuum heterozygot ist:

Unterschied zwischen normalen Zellen und Tumorzellen

X_V^m	= methyliertes/inaktiviertes, väterliches Allel auf X-Chromosom, 300 bp lang
X_M^m	= methyliertes/inaktiviertes, mütterliches Allel auf X-Chromosom, 200 bp lang
X_V	= nicht-methyliertes/aktives, väterliches Allel
X_M	= nicht-methyliertes/aktives, mütterliches Allel

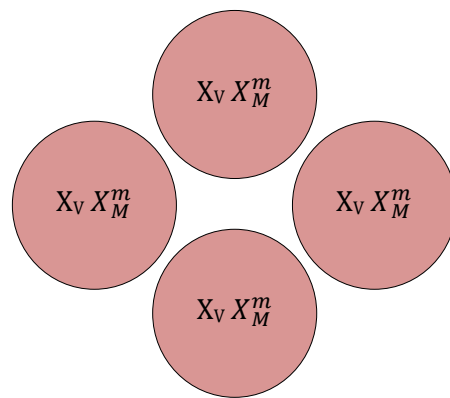
Normale Zellen:

Mosaik aus unterschiedlich methylierten Allelen eines Gens auf den X-Chromosomen.



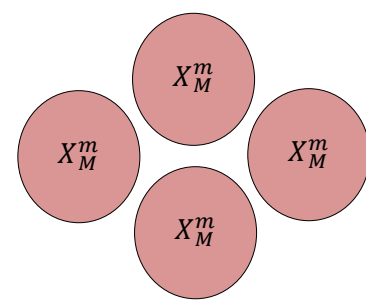
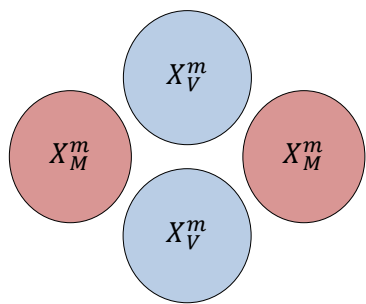
Klonale Tumorzellen:

Es ist immer das gleiche Allel auf den X-Chromosomen methyliert, in diesem Fall das mütterliche.



Verdau mit *Hpa*II

⇒ die nicht-methylierten Allele werden zerschnitten, übrig bleiben die methylierten Allele



Polymerase-Kettenreaktion + Gelelektrophorese



Bei normalen Zellen trennen sich nach dem Verdau mit *Hpa*II zwei Produkte der Polymerase-Kettenreaktion in der Gelelektrophorese auf, bei klonalen Tumorzellen nur ein Produkt!

2.1.4.1 Das Androgenrezeptor-Gen

Ein Gen, welches sich besonders gut für die XCIMA eignet, ist das AR-Gen.

Das humane AR-Gen (HUMARA-Gen) ist ein X-chromosomal gebundenes Gen mit einer Länge von ca. 90 kb und 8 Exons (Kuiper et al., 1989). In über 90 % der Frauen liegt es heterozygot vor (Diaz-Cano et al., 2001) und verfügt über 17 Allele (Mannhalter & Mitterbauer, 1998). In Exon 1 befinden sich mehrere Trinukleotid-Wiederholungen (Repeats). Darunter drei Cytosin - Adenin - Guanin (CAG) Repeats und ein Guanin - Guanin - Cytosin (GGC) Repeat (Lai et al., 2008), welche für die Polyglutamin- und Polyglycin-Bereiche in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne des AR kodieren (Pan et al., 2016). Beim Menschen sind nur das erste CAG Repeat und das GGC Repeat polymorph. Der erste CAG Mikrosatellit enthält im Normalfall 11 - 36 Repeats (Chamberlain et al., 1994). Durch die Länge der beiden Mikrosatelliten wird die Transaktivierungsfunktion des AR beeinflusst und zwar dahingehend, dass längere CAG oder GGC Repeats seine Transkriptionsaktivität vermindern (Sasaki et al., 2003; Chamberlain et al., 1994). Sasaki et al. (2003) sehen darin eine Abschwächung des antiproliferativen Effekts auf verschiedene Steroid-sensible Gewebe, was die Karzinogenese in diesen Geweben fördern könnte. In ihrer Studie fanden sie einen Zusammenhang zwischen längeren GGC Repeats des AR-Gens und der Inzidenz von Östrogen-induzierten Krebsarten. Aber auch kurze Repeats können in Verbindung gebracht werden mit verschiedenen Erkrankungen. So fanden Hsing et al. (2000) und Stanford et al. (1997) einen Zusammenhang zwischen kurzen CAG Repeats und der Entstehung von Prostatakrebs beim Menschen.

In Exon 1 des humanen AR-Gens in proximaler Nachbarschaft der CAG Repeats befinden sich CpG-Inseln. Innerhalb dieser CpG-Inseln liegen bestimmte Sequenzen (z. B. CCGG), die in der XCIMA als Erkennungssequenz für methylierungssensitive Restriktionsendonukleasen (*HpaII* und *HhaI*) genutzt werden können. Diese Enzyme können die DNA an diesen ganz spezifischen Stellen schneiden. Das Exon 1 des humanen AR-Gens beinhaltet in seinen CpG-Inseln zwei *HpaII* Schnittstellen (Uchida et al., 2000) sowie zwei *HhaI* Schnittstellen, deren Methylierung mit der X-Inaktivierung korreliert (Allen et al., 1992). Die Restriktionsendonukleasen erkennen ihre Sequenzen am fehlenden Methylierungsmuster und schneiden somit nur aktive DNA-Sequenzen. Die in der Humanmedizin für Tumoren von Frauen entwickelte XCIMA, welche auf den CAG Polymorphismus des humanen AR-Gens zielt, heißt HUMARA-Assay (Peng et al., 1997).

Das kanine AR-Gen (CANARA-Gen) ist dem humanen sehr ähnlich. Es ist ebenfalls ein X-chromosomal gebundenes Gen und enthält im Exon 1 drei CAG Repeats und ein GGC Repeat (Lu et al., 2001). Im Gegensatz zum humanen Gen sind jedoch zwei der drei CAG

Repeats polymorph (Shibuya et al., 1993). Die Repeatlänge des ersten Mikrosatelliten beträgt 9 - 12 Repeats, die des zweiten 10 - 14 Repeats (Mochizuki et al., 2012 & 2015). Lai et al. (2008) konnten ähnlich dem Menschen einen Zusammenhang zwischen einer kurzen Länge des ersten Mikrosatelliten und der Entstehung von Prostatakrebs beim Hund herausstellen.

In den beiden Mikrosatelliten des kaninen AR-Gens finden sich jeweils zwei *HpaII* Schnittstellen (Mochizuki et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit konnten zudem weitere drei *HpaII* Schnittstellen befundet werden, die zwischen den beiden Mikrosatelliten liegen (Delcour et al., 2013). Beim kaninen AR-Gen wird in der Literatur über eine Heterozygotie-Rate von 41% (Shibuya et al., 1993) und 49,3% (Mochizuki et al., 2015) berichtet.

Das feline AR-Gen (FELARA-Gen) wurde 2005 sequenziert (Poux et al.). Es beinhaltet zwei Bereiche von repetitiven CAG Sequenzen und drei *HpaII* Schnittstellen; von den CAG Repeats ist nur das zweite polymorph und seine Länge variiert zwischen 15 - 22 Repeats (Mochizuki et al., 2012). Nähere Untersuchungen zu den beiden CAG Repeats und zu den Unterschieden zum Exon 1 des kaninen AR-Gens sind in der Literatur bisher nicht beschrieben und sollen Bestandteil dieser Arbeit sein. Beim feline AR wird über eine Heterozygotie-Rate von 68% (Mochizuki et al., 2012) berichtet.

In der Humanmedizin stellt der HUMARA-Assay eine häufig angewandte Methode zur Klonalitätsbestimmung dar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des humanen AR-Gens mit dem des Hundes und der Katze wurden für diese Spezies ähnliche Assays abgeleitet (Wagner et al., 1995; Mochizuki et al., 2012).

2.1.4.2.....Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die an spezifische Erkennungssequenzen von doppelsträngiger DNA binden und diese an diesen Stellen schneiden können. Es werden vier Haupttypen unterschieden, die sich noch in mehrere Subtypen aufspalten. In der Molekularbiologie werden hauptsächlich die Restriktionsendonukleasen vom Typ II eingesetzt, zu denen z. B. die CpG-methylierungssensitiven Restriktionsenzyme *HpaII* und *HhaI* gehören. Diese Typ II Enzyme binden an die DNA bei fehlendem Methylierungsmuster und schneiden in ihrer Erkennungssequenz oder in unmittelbarer Nähe dazu. (Wikipedia Autoren, 2020, 27. Februar) Die methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen sind essentielle Werkzeuge in der XCIMA. Mit ihnen kann zwischen aktiven und inaktivierten DNA-Sequenzen unterschieden werden.

HpaII (aus *Haemophilus parainfluenzae*) bindet an der Erkennungssequenz 5'-CCGG-3' in einer CpG-Insel und schneidet zwischen den Cytosinen, wenn diese nicht methyliert sind.

Bei der X-Chromosom-Inaktivierung liegt immer derjenige Cytosinrest methyliert vor, der 5' vor dem Guanosinrest lokalisiert ist: 5'-C^mCGG-3' (Hörbe, 2005).

HhaI (aus *Hämophilus haemolyticus*) bindet an der Erkennungssequenz 5'-GCGC-3' und schneidet zwischen dem 3' Guanosin- und Cytosinrest (Horton et al., 2020), wenn der Cytosinrest nicht methyliert ist (Allen et al., 1992).

Vorteil der *HhaI* ist, dass sie eine Aktivität mit einzelsträngiger DNA hat, welche *HpaII* fehlt. Somit kann auch einzelsträngige DNA, wie sie häufig in FFPE-Material aufgrund der partiellen DNA-Denaturierung vorkommt, untersucht werden. (Diaz-Cano et al., 2001)

2.1.4.3 Extraktion von DNA aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben

Für Klonalitätsanalysen wird meistens genomische DNA verwendet, da sie robuster ist als RNA und somit auch von etwas niedrigerer Qualität sein kann, wie dies z. B. bei FFPE-Geweben der Fall ist (Keller et al., 2016).

In FFPE-Geweben liegt die DNA aufgrund der Fixation degradiert vor. Formaldehyd denaturiert die DNA in den Adenin - Thymin (AT) reichen Regionen der Doppelstrang-DNA. Es interagiert auf vier Arten mit der DNA: 1. Es fügt den Nukleotidbasen eine Hydroxymethyl-Gruppe hinzu. 2. Es formt eine Methylen-Gruppe zwischen zwei Amino-Gruppen. 3. Es hydrolysiert N-Glycosyl-Brücken zwischen Pyrimidinen bzw. Purinen und ihren zugehörigen Pentosen. 4. Es hydrolysiert die Phosphodiesterbindungen zwischen den Pentosen. Durch diese Interaktionen mit der DNA zerstört Formaldehyd die Wasserstoffbrückenbindungen von Basenpaaren, die Phosphodiesterbindungen benachbarter Basen sowie die Basen-Stapelkräfte. Dies führt zur Fragmentierung der DNA und damit häufig zu einem niedrigmolekularen Gewicht der PCR-Produkte von 500 bp oder weniger. Des Weiteren kann Formaldehyd zu einer Cytosin-Vernetzung innerhalb der DNA-Stränge führen. In einer PCR kann dann die Taq-Polymerase die Cytosine nicht mehr erkennen und fügt andere Nukleotide ein, wodurch eine andere Sequenz polymerisiert wird. (Srinivasan et al., 2002)

Bei FFPE-Geweben ist es aufgrund der DNA-Denaturierung schwieriger genügend intakte DNA zu gewinnen als aus frisch gefrorenem Gewebe.

Für die PCR wird eine Menge von ca. 2 ng initialer DNA pro µl Gesamtvolumen empfohlen (Keller et al., 2016). Die Länge der DNA-Fragmente sollte möglichst mehr als 300 bp umfassen. Um bei der Probengewinnung aus FFPE-Geweben eine brauchbare Menge an DNA zu erhalten, sind folgende Faktoren entscheidend: Die Paraffinschnitte sollen nicht dicker als 2 µm sein, um eine gründliche Homogenisierung für einen anschließenden ergiebigeren Verdau der Protein-DNA-Vernetzung zu ermöglichen. Zu Beginn ist auf die richtige Hitzebehandlung (98°C) zu achten. Für die Denaturierung von Formalin induzierten DNA-

Protein-Verbindungen sollte ein verlängerter Verdau mit der hierfür eingesetzten Proteinase K bei 55 bis 60° über mind. 48h (Weiss et al., 2011 a) bzw. über 5 - 7 Tage (Diaz-Cano et al., 2001) angesetzt werden. Am Ende der DNA-Extraktion empfehlen Weiss et al. (2011 a) und Keller et al. (2016) die DNA-Qualität mittels Gelelektrophorese zu überprüfen. Die einzelnen Schritte der DNA-Extraktion aus FFPE-Geweben beschreiben Weiss et al. (2011 a) ausführlich in der Literatur.

2.2 Kanine kutane Histiozytome - klinisch-diagnostische Grundlagen

Das kanine kutane Histiozytom ist der am häufigsten vorkommende Hauttumor junger Hunde unter zwei Jahren (Taylor et al., 1969). Das Auftreten von Histiozytomen verringert sich ab etwa drei Jahren, ist aber bei Hunden allen Alters beschrieben (Taylor et al., 1969; Coomer & Liptak, 2008; Schwens et al., 2011; Moore, 2014).

Histiozytome sind solitäre (selten multiple), scharf begrenzte, schnell wachsende, kleine, feste, noduläre, epitheliale und dermale Läsionen. Histiozytome treten vor allem an Kopf und Extremitäten auf. Eine Rassedisposition wird beschrieben für Boxer, Dackel, Cocker Spaniel, Dogge und Bobtail (Taylor et al., 1969; Fulmer & Mauldin, 2007; Schwens et al., 2011). Es gibt keine signifikante Geschlechtsprädisposition, aber männliche Hunde scheinen etwas häufiger betroffen zu sein (Taylor et al., 1969; Spies, 2006).

In einigen Fällen wurde die Metastasierung eines solitären Histiozytoms in einen regionalen Lymphknoten beschrieben (Moore, 2014; Schwens et al., 2011).

Die auffälligste Eigenschaft des Histiozytoms ist seine spontane Regression, die in fast allen Fällen auftritt (Cockerell & Slauson, 1979; Kipar et al., 1998; Kaim et al., 2006) und die von einer massiven Entzündungszellinfiltration begleitet wird (Spies, 2006). Die Histiozytome werden progressiv mit Lymphozyten infiltriert (Cockerell & Slauson, 1979; Spies, 2006). Bei diesen Lymphozyten handelt es sich v. a. um zytotoxische CD8+ T-Zellen, welche vermutlich die Lysis der neoplastischen Histiozyten herbeiführen. Mit zunehmender Größe weisen Histiozytome häufig starke Ulzerationen bis hin zu Nekrosen auf. Bereits bei kleinen Histiozytomen finden sich Anzeichen einer fortgeschrittenen Regression, daher beginnt diese vermutlich schon zu Beginn des Tumorwachstums. (Spies, 2006)

Die Regression findet über einen Zeitraum von ein bis zwei Monaten statt, kann aber länger dauern, falls multiple Läsionen vorliegen (Coomer & Liptak, 2008; Schwens et al., 2011). Aufgrund seines biologischen Verhaltens wurde lange angenommen, dass es sich beim Histiozytom um eine reaktive Hyperplasie von Langerhans-Zellen (Scott et al., 2001) oder um ein Hamartom handelt. Eine andere Vermutung war, dass das Histiozytom eine Antwort auf

einen unbekanntem Stimulus darstellt, durch den eine dermale Invasion und lokale Proliferation von aus Knochenmark stammenden Makrophagen induziert wird (Kipar et al., 1998).

Die Ursprungszelle des kaninen kutanen Histiocytems ist ein Histiocyt, der eine Differenzierung zur Langerhans Zelle zeigt (Moore, 2014). Dies basiert auf Untersuchungen, die gezeigt haben, dass Histiocytom-Zellen die gleiche Ultrastruktur wie Langerhans-Zellen haben und wie diese CD1a und E-Cadherin exprimieren (Marchal et al., 1995; Moore et al., 1996; Baines et al., 2008). Langerhans-Zellen gehören zu den myeloisch-dendritischen Zellen, deren Ursprungszelle eine CD34+ Stammzelle im Knochenmark ist (Schwens et al., 2011; Moore, 2014). Vom Knochenmark aus migrieren die unreifen dendritischen Zellen in verschiedene Organe des Körpers. Langerhans-Zellen treten v. a. in der Epidermis (Schwens et al., 2011) und in den Epithelien des Gastrointestinal-, des Atem- und des Genitaltraktes auf (Merad et al., 2008). Ihre Differenzierung zu Langerhans-Zellen wird beeinflusst durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie z. B. den Tumornekrosefaktoren α und β (TNF- α und TNF- β). Insbesondere TNF- β_1 , welcher von epidermalen Keratinozyten gebildet wird, ist essentiell für ihre Differenzierung (Moore, 2014). TNF β stimuliert zudem die Expression von E-Cadherin und induziert die Bildung von Birbeck-Granula, die für Langerhans-Zellen typisch sind (Schwens et al., 2011). Nach Antigenkontakt wird die Langerhans-Zelle aktiviert und migriert über das Blut oder die Lymphe in Lymphknoten oder Milz, um die Antigene den T-Lymphozyten zu präsentieren und dadurch eine Immunantwort auszulösen (Tizard, 2004). Histiocytome entstehen in der Dermis und können die Epidermis infiltrieren (Moore, 2014). Dies sieht Moore (2014) als Indiz, dass Histiocytome nicht direkt aus intraepidermalen Langerhans-Zellen entstehen, sondern eventuell aus einer CD14+ Langerhans-Zell-Vorläuferzelle, die häufig in dermalen perivaskulären Lokalisationen vorkommt.

Das kanine kutane Histiocytom ist neben dem metastasierenden Histiocytom und der Langerhans-Zell-Histiocytose eine Unterform des kutanen Histiocytomkomplexes, alle Unterformen dieses Komplexes gehen von Langerhans-Zellen (oder deren Vorläuferzellen) aus (Schwens et al., 2011). Der kutane Histiocytomkomplex wird von Schwens et al. (2011) ebenso wie das histiozytäre Sarkom und die dendritische Leukämie als Neoplasie eingestuft und von den reaktiven Formen histiozytärer Erkrankungen (reaktive Histiocytose, hämophagozytäres Syndrom) unterschieden.

In Bezug auf die Diagnostik von kaninen histiozytären Erkrankungen ist eine zytomorphologische Unterscheidung oft nicht möglich, da histiozytäre Zellen sich morphologisch und funktionell sehr ähneln. Daher gehört zur Diagnosestellung neben der histologischen Untersuchung häufig auch die Immunphänotypisierung (Schwens et al., 2011). Einen Eingang in die Routinediagnostik hat die Immunphänotypisierung aber nicht gefunden, da viele der zur Differenzierung notwendigen Epitope bei Formalinfixierung nicht stabil bleiben, viele der notwendigen Oberflächenmarker kommerziell nicht erhältlich sind und die notwendige Gefrierbruch-

technik an unfixiertem Gewebe nur für wissenschaftliche Fragestellungen zur Verfügung steht (Schwens et al., 2011; Labor für klinische Diagnostik, 2008).

Aus diesem Grund ist es notwendig, weitere diagnostische Möglichkeiten zu entwickeln. Die Klonalitätsanalyse bietet einen interessanten Ansatz zur Unterscheidung neoplastischer von reaktiven Formen histiozytärer Erkrankungen.

2.3 Ziele und Hypothesen dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung zweier X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analysen für den Einsatz bei verschiedenen kaninen und feline Tumorentitäten aus FFPE-Material. Es sollen erste Anhaltspunkte über die Funktionalität dieses Testes bzgl. solider Tumoren aus archiviertem Material gewonnen werden. Die klonale Inaktivierung von X-Chromosomen bei kaninen und feline Tumoren soll an polymorphen Mikrosatelliten des Androgenrezeptor-Gens geprüft werden. Mit Hilfe dieser für Hunde und Katzen entwickelten Assays (CANARA- und FELARA-Assay) sollen folgende Hypothesen geprüft werden:

1. Hypothese: Das kanine kutane Histiocytom hat einen monoklonalen Ursprung und stellt damit einen „echten“ Tumor dar.
2. Hypothese: Das feline Androgenrezeptor-Gen enthält Mikrosatelliten, die sich für den Einsatz im FELARA-Assay eignen.
3. Hypothese: FFPE-Gewebe eignet sich für den CANARA- und den FELARA-Assay.
4. Hypothese: Der an kaninen kutanen Histiocytomen erprobte CANARA-Assay und der an Lymphomen erprobte FELARA-Assay können auch bei anderen Tumorentitäten angewandt werden.

3 EIGENE PUBLIKATIONEN IN WISSENSCHAFTLICHEN FACHZEITSCHRIFTEN

3.1 *Canine cutaneous histiocytomas are clonal lesions as defined by X-linked clonality testing*

Autoren: Delcour, N. M., Klopfleisch, R., Gruber, A. D., Weiss, A. T. A.

Jahr: 2013

Journal: *Journal of Comparative Pathology*

Quellenangabe: Delcour, N. M., Klopfleisch, R., Gruber, A. D., Weiss, A. T. A. (2013). Canine cutaneous histiocytomas are clonal lesions as defined by X-linked clonality testing. *Journal of Comparative Pathology*, 149 (2 - 3): 192 - 198. DOI: 10.1016/j.jcpa.2013.01.004

You have to purchase this part online.

<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.01.004>

Erklärung der Eigenleistung in dieser Publikation:

Beitrag von N. M. Farwick, geb. Delcour: Design, Vorbereitung, mehrfache Durchführung und Evaluation aller Experimente incl. Makrodissektion des Probenmaterials aus FFPE-Blöcken, Nukleinsäure-Extraktion nach Protokoll von Weiss et al. (2011 a) mittels Gentra® Puregene® Gewebe Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), Überprüfung der Probenqualität mittels Gelelektrophorese, Durchführung der PCR mit und ohne Restriktionsendonuklease-Verdau, Evaluation verschiedener Elektrophoresesysteme, Elektrophoreseanalyse mittels Bio-Rad und eigenständiger Anfertigung des gesamten Manuskriptes.

Beiträge anderer Autoren:

Alle Co-Autoren wirkten beim Studiendesign, der Evaluation der Ergebnisse und der Überprüfung des Manuskriptes unterstützend mit.

3.2 Microsatellites within the feline androgen receptor are suitable for X chromosome-linked clonality testing in archival material

Autoren: Farwick, N. M., Klopfleisch, R., Gruber, A. D., Weiss, A. T. A.

Jahr: 2017

Journal: *Journal of Feline Medicine and Surgery*

Quellenangabe: Farwick, N. M., Klopfleisch, R., Gruber, A. D., Weiss, A. T. A. (2017). Microsatellites within the feline androgen receptor are suitable for X chromosome-linked clonality testing in archival material. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19 (4): 454 - 460. DOI: 10.1177/1098612x16634386

You have to purchase this part online.

<https://doi.org/10.1177/1098612x16634386>

Erklärung der Eigenleistung in dieser Publikation:

Beitrag von N. M. Farwick: Design, Vorbereitung, mehrfache Durchführung und Evaluation aller Experimente incl. Makrodissektion des Probenmaterials aus FFPE-Blöcken, Nukleinsäure-Extraktion nach Protokoll von Weiss et al. (2011 a) mittels Gentra® Puregene® Gewebe Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), Überprüfung der Probenqualität mittels Gelelektrophorese, Durchführung der PCR mit und ohne Restriktionsendonuklease-Verdau, Evaluation verschiedener Elektrophoresesysteme, Elektrophoreseanalyse mittels Bio-Rad und eigenständiger Anfertigung des gesamten Manuskriptes.

Beiträge anderer Autoren:

Alle Co-Autoren wirkten beim Studiendesign, der Evaluation der Ergebnisse und der Überprüfung des Manuskriptes unterstützend mit.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung zweier X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analysen für den Einsatz bei kaninen und felines Tumorentitäten aus FFPE-Material. Alle durchgeführten Analysen wurden mindestens einmal, meistens jedoch mehrfach reproduziert, um valide Daten zu erhalten.

Mit Hilfe dieser für Hunde und Katzen entwickelten Assays sollen folgende Hypothesen geprüft werden:

4.1 Erste Hypothese

Das kanine kutane Histiozytom hat einen monoklonalen Ursprung und stellt damit einen „echten“ Tumor dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden elf Histiozytome weiblicher, heterozygoter Hunde mittels CANARA-Assay auf Klonalität untersucht. Jedes dieser Histiozytome deckte ein nicht zufälliges monoklonales Methylierungsmuster am AR-Genlokus auf.

Die Hypothese, dass diese monoklonalen Methylierungsmuster Rückschlüsse auf monoklonale Ursprünge der Histiozytome zulassen und diese somit als „echte“ Tumoren von reaktiven Formen histiozytärer Erkrankungen unterschieden werden können, ist zu überprüfen. Dazu gilt es zunächst die möglichen Fehlerquellen der XCIMA zu beleuchten.

4.1.1 Fehlerquellen der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse

Die XCIMA beruht auf der Basis des Konzeptes der monoklonalen Tumorentstehung. Wird Gewebe eines monoklonalen Tumors der XCIMA unterzogen, ergibt dieses theoretisch ein monoklonales, nicht zufälliges Methylierungs-/Inaktivierungsmuster. Ein gesundes normales Gewebe besteht im Gegensatz dazu aus polyklonalen Zellpopulationen und zeigt in der XCIMA ein polyklonales, zufälliges Inaktivierungsmuster.

Die Ergebnisse der XCIMA müssen hinsichtlich begrenzter Sensitivität und Spezifität kritisch hinterfragt werden. Es können monoklonale Inaktivierungsmuster entstehen, obwohl das Gewebe polyklonal ist (falsch monoklonale Inaktivierungsmuster) oder polyklonale Muster, obwohl das Gewebe monoklonal ist (falsch polyklonale Inaktivierungsmuster). Würde aufgrund eines polyklonalen Inaktivierungsmusters ein Tumor fälschlicherweise ausgeschlossen, hätte das fatale Folgen für das Tier. Auch ein monoklonales Inaktivierungsmuster muss

nicht zwangsläufig auf einen Tumor verweisen und eine entsprechend aggressive Therapie nach sich ziehen.

4.1.1.1.....Ursachen für falsch monoklonale Inaktivierungsmuster

4.1.1.1.1 Pseudomonoklonalität

Pseudomonoklonalität kann sowohl in gesundem Gewebe als auch in Tumoren auftreten.

In gesundem Gewebe kann sich eine Pseudomonoklonalität beispielsweise bei der klonalen Expansion von Lymphozyten als Antigenantwort entwickeln. Infolge einer Antigen-Stimulation kommt es im Rahmen der normalen Immunantwort zu einer klonalen Expansion von Lymphozyten. Normalerweise sind viele verschiedene Lymphozyten betroffen, so dass sich ein polyklonales Inaktivierungsmuster der Zellen in der XCIMA ergibt. In manchen Fällen aber proliferiert ein Klon disproportional und führt zu falsch monoklonalen Ergebnissen in der XCIMA. In der Humanmedizin sind solche Phänomene untersucht worden und es zeigte sich ein Zusammenhang mit infektiösen Agentien, Medikamenten, Neoplasien oder Autoimmunerkrankungen (Alaibac et al., 1993; Brady et al., 1999; Magro et al., 2003). In der Veterinärmedizin werden gutartige Klone vermutet, sind aber kaum dokumentiert. (vgl. Keller et al.; 2016)

Pseudomonoklonalität tritt auch bei Tumorgewebe auf. Während der Tumorprogression eines reifen Tumors kann es zu einem Wachstumsvorteil eines Zellklons gegenüber den anderen gekommen sein. Bei einem Tumor multiklonalen Ursprungs würde in so einem Fall ein falsch monoklonales Inaktivierungsmuster in der XCIMA entstehen.

Zur Vermeidung falsch monoklonaler Ergebnisse ist es bei der Probenentnahme für die XCIMA wichtig, auf eine ausreichende Zellgewinnung möglichst aus verschiedenen Bereichen eines Tumors zu achten. Je niedriger die Zellzahl einer Probe, desto höher die Wahrscheinlichkeit für falsch monoklonale Inaktivierungsmuster (Diaz-Cano et al., 2001). Diaz-Cano et al. (2001) empfehlen daher die Probenentnahme an verschiedenen Stellen der Proliferation mit einer Probengröße von mind. 100 Zellen oder 25 mm².

4.1.1.1.2 Patch-size-Phänomen

Schmidt und Mead entwickelten in den 1990er Jahren das Konzept des *Patch-size*-Phänomens. Ein Patch ist eine Gruppe aus genetisch gleichen Zellen, die von einer normalen Stammzelle ausgegangen ist. Normalerweise verteilen sich die Tochterzellen aller Stammzellen im Gewebe, so dass ein Mosaik aus genetisch verschiedenen Zellen entsteht.

Beim *Patch-size*-Phänomen ist das anders. Hier kommt es zur Ansammlung von Tochterzellen einer Stammzelle nebeneinander an einem Ort im Gewebe. Das Patch ist damit das Ergebnis klonalen Wachstums in einem kleinen Bereich. Bei allen Zellen dieses Gewebefeldes ist dadurch das gleiche X-Chromosom inaktiviert. Es können sehr große und auch kleine Patches vorliegen. Ein Patch kann aus 200 oder mehr Zellen bestehen und einen Durchmesser von 2 – 3 mm haben, in manchen Geweben auch größer. Die Patch-Größe beim Menschen beträgt in der Schilddrüse 0,48 – 1,28 cm² (Jovanovic et al., 2003), in Blase und Magen bis 1 cm², in anderen Geweben nur 0,2 – 0,3 cm². (Cheng et al., 2008 a)

Die Patch-Größen und das Auftreten von Patches sind größtenteils gewebetypisch. Epithelgewebe beispielsweise ist häufig in Patches organisiert (Going, 2003; Jovanovic et al., 2003; Cheng et al., 2008 a).

Entwickelt sich in einem Patch eine polyklonale Proliferation wird diese in der XCIMA als monoklonal detektiert, da bei dieser Klonalitätsanalyse nur der Aktivierungsstatus der X-Chromosomen untersucht wird und nicht der eigentliche genetische Unterschied der Zellen (Parsons, 2018). Mit der XCIMA ist es somit nicht möglich polyklonale Proliferationen innerhalb eines Patches zu detektieren. Eine polyklonale Proliferation kann nur dann mit Hilfe der XCIMA als richtig polyklonal detektiert werden, wenn sie grenzübergreifend in zwei Patches liegt, die einen gegensätzlichen X-Chromosom-Aktivierungsstatus haben (Parsons, 2018, Leedham & Wright, 2008; Novelli et al., 2003).

Cheng et al. (2008 a) geben zu Bedenken, dass ohne Beachtung des *Patch-size*-Phänomens die XCIMA in menschlichem Gewebe nicht aussagekräftig ist, v. a. nicht bei epithelialen Neoplasien. Um zwischen normalem Patch und abnormer monoklonaler Proliferation besser unterscheiden zu können, empfehlen sie, die Proben an vielen verschiedenen Stellen des Tumors zu entnehmen. Zur sicheren Diagnosestellung allerdings müsste die Klonalität gezielt an genetischen Veränderungen nachgewiesen und nicht aus dem Inaktivierungsmuster abgeleitet werden. Jovanovic et al. (2003) empfiehlt zusätzlich zur Tumoruntersuchung die nähere Tumorumgebung auf möglicherweise vorliegende *Patch-size*-Phänomene zu untersuchen. Dies ist in archiviertem Material jedoch nicht möglich.

Für zukünftige XCIMA wären Studien, die die Patch Größen und Lokalisationen bei Tieren evaluieren, wünschenswert.

4.1.1.1.3 Methylierungsabnormitäten der X-Chromosomen

Der AR-Genlocus konnte von Allen et al. (1992) als zuverlässiger Genlocus für den HUMARA-Assay dargestellt werden, dessen Methylierung in den *HpaII*- und *HhaI*-Sequenzen mit der X-Chromosom-Inaktivierung korreliert. Allerdings konnten Busque et al. (1996) in einer

Studie feststellen, dass bei einem Drittel gesunder Frauen > 60 eine Methylierungsabnormalität am AR-Genlocus vorliegt und diese Methylierungsabnormalität mit dem Alter korreliert.

Wenn bei älteren Individuen in mehr als 75 % der Zellen das gleiche elterliche Allel methyliert vorliegt, bedeutet das für die XCIMA, dass eine polyklonale Proliferation nicht mehr als solche erkannt würde, sondern ein falsch monoklonales Inaktivierungsmuster dargestellt würde.

Swierczek et al. (2012) stellten die Hypothese auf, dass eine Heterogenität des AR-Genlocus ursächlich für die Methylierungsabnormalitäten mancher älterer Frauen sein könnte. Wenn z. B. eine Hypermethylierung der CpG-Inseln im Exon 1 nicht mit dem Methylierungsstatus der Promotorstelle des AR-Gens übereinstimmt, wird dieses Gen exprimiert, obwohl die XCIMA es als inaktiv detektieren würde. Wenn bei über 75 % der Zellen diese Hypermethylierung der CpG-Inseln im Exon 1 vorläge, würde eine polyklonale Läsion als falsch monoklonal detektiert. Swierczek et al. (2012) fanden v. a. bei Granulozyten Hinweise auf Methylierungsabnormalitäten infolge Hypo- oder Hypermethylierung in den CpG-Inseln in Exon 1, die nicht zum Aktivierungszustand passten.

Abkowitz et al. (1998) beschreiben auch bei älteren Katzen veränderte X-Chromosom-Inaktivierungsmuster, allerdings durch Analyse der G6PD-Isoenzyme, nicht durch Bestimmung des Methylierungsstatus. Ob bei älteren Katzen ähnliche Methylierungsabnormalitäten wie beim Menschen vorliegen, ist daher nicht belegt. Bei Hunden konnten zwar veränderte Methylierungsmuster der gesamten DNA im Alter nachgewiesen werden (Thompson et al., 2017), allerdings liegen bei dieser Spezies noch keine Studien vor, die eine Methylierungsabnormalität der X-Chromosomen ähnlich der des Menschen darlegen. Zukünftig wären Studien zur Untersuchung von Methylierungsabnormalitäten älterer Hündinnen und Katzen interessant.

4.1.1.1.4 Technisch-methodischer Fehler

Eine unterschiedlich effiziente Amplifikation verschieden langer Allel-Fragmente kann zu einem falsch monoklonalen Inaktivierungsmuster führen. Swierczek et al. (2012) konnten in ihrer Studie feststellen, dass der HUMARA-Assay, wie andere PCR-Untersuchungen auch, anfällig gegenüber einer bevorzugten Amplifikation kürzerer Allele ist. Wenn das längere Allel in der XCIMA nicht amplifiziert würde, ergäbe dies bei der Untersuchung einer polyklonalen Läsion ein falsch monoklonales Inaktivierungsmuster. Da jedoch bei der XCIMA zu Beginn auf Heterozygotie des Gewebes getestet wird und dort beide Allele gleichermaßen amplifizierbar sein müssen, damit die Gewebeprobe überhaupt für die XCIMA zugelassen wird, ist dieser Fehler eher unwahrscheinlich.

4.1.1.2 Ursachen für falsch polyklonale Inaktivierungsmuster

4.1.1.2.1 Verunreinigung der Probe mit nicht neoplastischen Zellen

Wenn überproportional viele nicht neoplastische Zellen (Entzündungszellen, Endothelzellen etc.) im Tumorgewebe vorhanden sind, kann durch diese polyklonale Population ein monoklonales Inaktivierungsmuster verdeckt werden (Keller et al., 2016). Mochizuki et al. (2015) empfehlen, die Rate an nicht neoplastischen Zellen unter 50 % zu halten. Vor der XCIMA sollte bestenfalls eine mikroskopische Analyse des Gewebes durchgeführt werden.

4.1.1.2.2 Tumor-Hypomethylierung oder -Hypermethylierung

Epigenetische Läsionen, wie eine Veränderung der DNA-Methylierung, kommen bei Tumoren häufig vor.

Bei einer Hypomethylierung eines zu untersuchenden Genlokus in einem Tumor werden beide Allele in der XCIMA mittels Restriktionsendonukleasen verdaut. In der anschließenden PCR werden dann möglicherweise nur noch die Allele nicht neoplastischer Zellen, die ggf. in der Probe mit vorhanden waren, amplifiziert. Ein falsch polyklonales Inaktivierungsmuster kann die Folge sein.

Bei einer Hypermethylierung eines zu untersuchenden Genlokus in einem Tumor liegen beide Allele methyliert vor, so dass keines mehr von den Restriktionsendonukleasen verdaut wird und beide in der PCR amplifiziert werden. Folglich entsteht ebenfalls ein falsch polyklonales Inaktivierungsmuster.

Studien haben gezeigt, dass eine Hypermethylierung des AR-Genlokus beim menschlichen Lymphom vorkommt (McDonald et al., 2000). Bei Hunden und Katzen gibt es diesbezüglich noch keine Studien.

4.1.1.2.3 Technisch-methodischer Fehler

Bei einem nicht kompletten Verdau des nicht methylierten Allels durch die Restriktionsendonuklease werden sowohl inaktivierte als auch aktive Allele nach dem Verdau amplifiziert. In der Gelelektrophorese trennen sich zwei PCR-Produkte auf, die bei einem monoklonalen Tumor als falsch polyklonal interpretiert werden können. Zur Vermeidung dieses Fehlers sollten parallel Verdaukontrollen männlicher Tiere durchgeführt werden.

Die vielen möglichen Fehlerquellen bei der Durchführung der XCIMA und ihrer Auswertung implizieren, dass ein einfacher Rückschluss aus den Ergebnissen ohne ausführliche Interpretation im Zusammenhang mit anderen diagnostischen Daten für keinen Tumor möglich ist.

4.1.2 Beurteilung der Klonalität von Histozytomen in der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse

Alle elf kaninen kutanen Histozytome, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, deckten ein nicht zufälliges, monoklonales Inaktivierungsmuster auf. Es gilt zu überprüfen, ob dieses Muster falsch monoklonal sein könnte.

Zum Studienablauf muss zunächst betont werden, dass alle elf Histozytome, von denen die Gewebeproben für die XCIMA gewonnen wurden, bereits zuvor histomorphologisch eindeutig als kanine kutane Histozytome diagnostiziert wurden. Histozytome mit signifikanten, reaktiven Entzündungszellinfiltraten oder schweren Ulzerationen wurden von der XCIMA ausgeschlossen.

Die Gewebeproben für die XCIMA wurden mittels Makrodissektion aus FFPE-Gewebeblöcken gewonnen. Dafür wurde der Wachsblock zuvor beschnitten, um sicherzustellen, dass jeder Schnitt mind. 70 % Tumorgewebe enthält. Aufgrund der Makrodissektionstechnik wurden so große Bereiche der jeweiligen Tumoren erfasst, dass von einer Repräsentativität der gewonnenen Zellen für alle im Tumor vorhandenen Zellen ausgegangen werden kann. Mögliche gutartige dominante Zellklone, die ein falsch monoklonales Inaktivierungsmuster verursachen könnten, sollten mit der Makrodissektionstechnik berücksichtigt worden sein. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich in Histozytomen ein Wachstumsvorteil eines einzelnen Klons manifestiert sehr gering, da es sich um sehr schnell wachsende Proliferationen junger Hunde handelt. Diese Annahme wird gestützt durch Untersuchungen, die gezeigt haben, dass *early stage* Tumoren in der Regel eher heterotypisch und *later stage* Tumoren eher monotypisch sind (Parsons, 2018), dies bedeutet, dass Wachstumsvorteile einzelner Subklone meist erst in der fortgeschrittenen Tumorentwicklung manifest werden. Insgesamt kann eine **Pseudomonoklonalität** damit für die untersuchten Histozytome weitestgehend ausgeschlossen werden.

Histozytome gehen von Langerhans-Zellen aus, deren Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in die Haut eingewandert sind. Da es sich bei diesen Zellen somit nicht um Zellen eines embryonal entstandenen Gewebeverbandes handelt, kann das Vorliegen eines **Patch-size-Phänomens** ausgeschlossen werden.

Eine **altersbedingte Methylierungsabnormität**, wie sie in der Humanmedizin bei 1/3 der älteren Frauen beschrieben ist, ist in der vorliegenden Studie aufgrund des jungen Alters der

Hunde sehr unwahrscheinlich. Zudem liegen keine Untersuchungen vor, dass diese Abnormalität bei Hunden vorkommt. Sollten jedoch auch bei jungen Hunden schon Methylierungsabnormalitäten der CpG-Inseln im Exon 1 des AR-Gens vorkommen, die nicht mit dem tatsächlichen Aktivierungsstatus der Promoterregion des X-Chromosoms übereinstimmen (Swierczek et al., 2012), so kann ein falsch monoklonales Inaktivierungsmuster nicht ausgeschlossen werden. Allerdings spricht dagegen, dass in der vorliegenden Arbeit alle Histiocytoome als monoklonal detektiert wurden. Swierczek beschreibt diese Methylierungsabnormalität der CpG-Inseln im Exon 1 nur bei 1/3 der untersuchten Frauen. Insgesamt gesehen ist daher eine solche Methylierungsabnormalität bei den untersuchten Histiocytoomen sehr unwahrscheinlich.

Eine **unterschiedlich effiziente Amplifikation** verschieden langer Allelfragmente nach dem Verdau mit *HpaII* kann in der vorliegenden Arbeit nahezu ausgeschlossen werden, da bei der Untersuchung der unverdauten Proben auf Heterozygotie bei allen Histiocytoomen beide Allele amplifiziert werden konnten. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass bei der Untersuchung auf Heterozygotie bei vielen Hunden die kurzen Allele effizienter amplifiziert wurden und damit das Tier als falsch homozygot beurteilt und von der XCIMA ausgeschlossen wurde. Dies könnte eine Erklärung für die niedrigen Heterozygotieraten in dieser Arbeit sein.

Im Gesamtzusammenhang mit der Tatsache, dass alle in der XCIMA untersuchten Histiocytoome bereits zuvor histomorphologisch eindeutig als kutane Histiocytoome diagnostiziert wurden und der Tatsache, dass mögliche Fehlerquellen der XCIMA hinsichtlich eines falsch monoklonalen Inaktivierungsmusters nahezu ausgeschlossen werden können, ist es sehr wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen monoklonalen Inaktivierungsmuster der untersuchten Histiocytoome tatsächlich monoklonal sind. Die XCIMA hat sich in der vorliegenden Arbeit als geeignetes Diagnostikum für den Klonalitätsnachweis kaniner kutaner Histiocytoome erwiesen, mit deren Hilfe diese Tumoren als monoklonale „echte“ Tumoren von reaktiven Formen histiozytärer Erkrankungen differenziert werden konnten. Damit unterstützt die vorliegende Arbeit die erste Hypothese.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 61 kanine kutane Histiocytoome weiblicher Tiere auf Heterozygotie des AR-Gens untersucht. Dabei fiel eine Besonderheit auf. Es stellte sich heraus, dass alle Hündinnen mit kutanem Histiocytom eine kurze und damit nicht polymorphe Version des ersten Mikrosatelliten (CANARA 1) zeigten. In der Literatur ist beschrieben, dass kurze Versionen des ersten CAG Repeats des AR-Gens mit Prostatakrebs bei Menschen (Hsing et al., 2000; Standford et al., 1997) und bei Hunden (Lai et al., 2008) assoziiert sind. Gao et al. konnten 1996 zeigen, dass ein AR-Gen mit kurzen CAG Repeats beim Menschen für einen AR mit höherer Transkriptionsaktivität kodiert. Eine höhere Transaktivierungsfunktion sehen Lai et al. (2008) als Trigger für eine schnellere Transformation einer

präneoplastischen in eine neoplastische Läsion. Auch Davey und Grossmann (2016) sehen einen möglichen Zusammenhang von AR-Aktivitäten im Zusammenhang mit der Entwicklung von Tumoren in Prostata, Blase, Leber, Nieren und Lunge beim Menschen.

Da in der vorliegenden Arbeit alle 61 Hündinnen mit kutanem Histiozytom die kurze CANARA 1 Variante des AR-Gens aufwiesen, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass möglicherweise ein Zusammenhang von kurzen CAG Repeats mit der Entstehung von Histiozytomen besteht. Zukünftige Studien sollten diese Hypothese überprüfen.

4.2 Zweite Hypothese

Das feline Androgenrezeptor-Gen enthält Mikrosatelliten, die sich für den Einsatz im FELARA-Assay eignen.

Das feline AR-Gen wurde 2005 von Poux et al. sequenziert. Mochizuki et al. (2012) fanden zwei CAG Repeats in diesem Gen, von denen sich nur das zweite als polymorph darstellte. Sie setzten diesen Mikrosatelliten erstmalig in der XCIMA bei Katzen ein.

In der vorliegenden Arbeit wurde das feline AR-Gen ebenfalls auf potentiell für die Klonalitätsanalyse nutzbare Mikrosatelliten hin untersucht. Sequenzanalysen (SeqLab) der amplifizierten PCR-Produkte ergaben in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mochizuki et al. (2012), dass das Exon 1 des AR-Gens zwei CAG Repeats in unmittelbarer Nähe zu CpG-Inseln enthält, von denen im Gegensatz zum Hund nur das zweite CAG Repeat polymorph und damit für die XCIMA nutzbar ist. Dieser zweite Mikrosatellit stellte sich in der vorliegenden Arbeit mit Längen von 16 – 20 Repeats dar. Mochizuki et al. (2012) detektierten dagegen Längen von 15 – 22 Repeats. Der CAG Längenpolymorphismus macht den zweiten Mikrosatelliten zu einer attraktiven Zielsequenz für die XCIMA.

Bei Hunden finden sich im zweiten Mikrosatelliten den CAG Wiederholungen zwischengeschaltete CAA Trinukleotide. Diese fehlen dem homogeneren feline Mikrosatelliten. Daraus resultiert wahrscheinlich eine höhere Rate an heterozygoten Katzen und führt somit zu einer besseren Anwendbarkeit dieses Tests bei Katzen als bei Hunden. Die vorliegende Arbeit kann diese Hypothese unterstützen, denn der Heterozygotierate von 37,5% (alle Gewebe) bzw. 45 % (nur Lymphome) bei Katzen (Farwick et al., 2017) steht eine Heterozygotierate von nur 19 % bei Hunden (Delcour et al., 2013) gegenüber. Allerdings ist die Heterozygotierate bei Katzen in der vorliegenden Arbeit mit 37,5 % bzw. 45 % deutlich geringer als in der oben genannten früheren Studie von Mochizuki et al. (2012), bei der über eine Heterozygotierate von 68 % berichtet wird. Eine ähnliche Abweichung findet sich auch bei der Analyse der Heterozygotierate bei Hunden: 19 % (Delcour et al., 2013) zu 41 % (Shibuya et al.,

1993), 49,3 % (Mochizuki et al., 2015) und 57,3 % (Tomita et al., 2019). Eine Ursache für die insgesamt niedrige Heterozygotierate im Vergleich zum Menschen (90 %, Diaz-Cano et al., 2001) kann insbesondere bei Hunden darin begründet sein, dass infolge selektiven Züchtens eine niedrige genetische Diversität bei reinrassigen Hunden vorliegt (Mochizuki et al., 2015). Bei Katzen könnte dies in abgeschwächter Form ebenfalls ursächlich sein. Ein weiterer Auslöser der extrem niedrigen Heterozygotierate in der vorliegenden Arbeit könnte zudem die Verwendung von FFPE-Material sein. Darauf wird im nächsten Kapitel eingegangen.

Tomita et al. veröffentlichten 2019 eine Studie, in der sie die Einsetzbarkeit der XCIMA bei Hunden verbesserten. In dieser Studie wurde zusätzlich zur Untersuchung der CAG Wiederholungen im kaninen AR-Gen eine weitere Zielsequenz (AC Repeats im SLIT und NTRK-like family member 4 (SLITRK4) Gen) untersucht. Bei Analyse beider Gene stellte sich in der oben genannten Studie eine Heterozygotierate von 83,3 % heraus, während die alleinige AR-Gen Untersuchung in der Studie eine Heterozygotierate von 57,3 % ergab. Unabhängig von der Spezies sollten zukünftige XCIMA zur Verbesserung der Anwendbarkeit mehr als eine polymorphe Region untersuchen.

Die Anwendbarkeit des zweiten Mikrosatelliten in der XCIMA wurde in der vorliegenden Arbeit an neun feline Lymphomen und zwei lymphatischen Hyperplasien getestet.

Bei dem Probenmaterial handelte es sich um bereits zuvor in einer anderen Studie gut untersuchte und eindeutig diagnostizierte Proliferationen (Weiss et al., 2010). Drei der Lymphome wurden zudem in einer weiteren Studie mittels Analyse rekombinierter Antigenrezeptor-Gene bereits als klonale Entitäten befundet, beide lymphatischen Hyperplasien als polyklonal (Weiss et al., 2011 b).

In der vorliegenden Arbeit zeigten acht der neun Lymphome heterozygoter Katzen ein nicht zufälliges, monoklonales Inaktivierungsmuster in der XCIMA, ein Lymphom hingegen ein zufälliges, polyklonales Inaktivierungsmuster. Bei zwei lymphatischen Hyperplasien ergaben sich polyklonale Inaktivierungsmuster.

Es gilt zu überprüfen, ob es sich um falsch monoklonale bzw. um falsch polyklonale Inaktivierungsmuster handeln könnte.

Die Annahme, dass es sich bei den in der Studie untersuchten Tumoren um gutartige, polyklonale Proliferationen handeln könnte, die falsch monoklonal beurteilt wurden, ist auszuschließen, da alle Tumoren in vorherigen Studien eindeutig als Lymphome diagnostiziert wurden. Malignitätsanzeichen waren vorhanden und drei der Lymphome wurden bereits durch Analyse rekombinierter Antigenrezeptor-Gene als monoklonal beurteilt. Es gilt somit nur zu prüfen, ob die als polyklonal befundenen Proliferationen falsch polyklonale Inaktivierungsmuster aufwiesen. Eine Lymphom-Probe zeigte ein polyklones Inaktivierungsmuster. Aufgrund der Tatsache, dass es sich um einen zuvor eindeutig als Lymphom diagnostizierten

Tumor handelte, ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein falsch polyklonales Muster handelt. So könnte eine Verunreinigung der Probe mit nicht neoplastischen Zellen (Entzündungszellen) sowie ein nicht kompletter Verdau des nicht methylierten Allels durch die Restriktionsendonuklease ursächlich sein. Auch eine Hypermethylierung des AR-Genlokus, wie sie beim menschlichen Lymphom beschrieben ist (McDonald et al., 2000) oder eine Hypomethylierung wie sie häufig bei Tumoren vorkommt, kann als Ursache für das falsch polyklonale Muster in Frage kommen.

Da auch die untersuchten lymphatischen Hyperplasien zuvor eindeutig als solche diagnostiziert wurden und keine Malignitätsanzeichen aufwiesen, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesen tatsächlich um polyklonale Proliferationen handelt.

In diesem Zusammenhang zeigt sich, wie wichtig andere diagnostische Daten für die richtige Diagnosefindung sind.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das feline AR-Gen einen hochpolymorphen Mikrosatelliten enthält, der sich aufgrund seiner Homogenität sehr gut für die XCI-MA eignet. Einzige Einschränkung ist die niedrige Heterozygotierate. Für die Anwendung in der Routinediagnostik müssen Assays entwickelt werden, die mehr als eine polymorphe Region untersuchen.

4.3 Dritte Hypothese

Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe eignet sich für den CANARA- und den FELARA-Assay.

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Proben aus FFPE-Gewebe untersucht. Ein Problem, das in der Literatur sehr häufig im Zusammenhang mit diesem Gewebe beschrieben wird, ist die Gewinnung ausreichender Mengen intakter DNA. In FFPE-Gewebe findet eine DNA-Denaturierung infolge der Formalinfixierung statt, die nicht selten zu einer Fragmentation der DNA ≤ 200 bp führt (Srinivasan et al., 2002).

Für eine PCR wird eine Mindestmenge von 2 ng initialer DNA pro μl Gesamtreaktionsvolumen empfohlen (Keller et al., 2016). Die Länge der DNA-Fragmente sollte möglichst mehr als 300 bp umfassen. Weiss et al. (2011 a) beschreiben ein effizientes und kostengünstiges Protokoll zur DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA nach diesem Protokoll extrahiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit flossen zum Teil in die Studie von Weiss et al. (2011 a) ein. Aus den kaninen kutanen Histiozytomen wurde eine mittlere DNA-Konzentration von ca. 1,2 ng/ μl und aus den feline Lymphomen von ca. 2,3 ng/ μl gewonnen. Die erhaltenen Fragmente waren mindestens 500 bp lang.

Damit reichte das gewonnene DNA-Material für die Anwendung in der XCIMA aus. Doch im Vergleich zu frischem Gewebe, bei dem Fragmente > 20 kbp gewonnen werden können (Weiss et al., 2011 a), zeigt die DNA-Gewinnung aus FFPE-Gewebe doch deutliche Einschränkungen. Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität wurde deshalb eine *nested-PCR* durchgeführt. Dies ist bei Anwendung von frischem oder gefrorenem Gewebe sehr wahrscheinlich nicht notwendig.

Durch den Einbettungsprozess wird DNA teilweise denaturiert und liegt dann vermehrt als einzelsträngige DNA vor (Diaz-Cano et al., 2001). Dies kann zu Problemen beim Verdau der DNA mit der Restriktionsendonuklease *HpaII* führen, da angenommen wird, dass diese keine Aktivität gegenüber einzelsträngiger DNA besitzt (Diaz-Cano et al., 2001). Aufgrund dieser Problematik wird in der Literatur die Anwendung der Restriktionsendonuklease *HhaI* empfohlen, die die besagte Aktivität sicher besitzt. In der vorliegenden Studie konnte die Problematik eines nicht vollständigen Verdau mit *HpaII* nicht bestätigt werden. Sämtliche Proben wurden mittels *HpaII* verdaut. Bei den Verdaukontrollen von DNA männlicher Tiere trennten sich keine PCR-Produkte in der Gelelektrophorese auf, was den vollständigen Verdau belegt.

In der vorliegenden Arbeit fiel eine sehr niedrige Heterozygotierate sowohl bei den Kaninchen als auch bei den feline Tumoren im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Heterozygotieraten dieser Spezies in anderen Studien auf (Mochizuki et al., 2012; Shibuya et al., 1993; Tomita et al., 2019). In diesen Studien wurde ausschließlich frisches oder frisch gefrorenes Material verwendet. Es stellt sich die Frage, ob FFPE-Gewebe einen Einfluss auf die Heterozygotierate bei Hunden und Katzen haben könnte. Bei FFPE-Gewebe findet aufgrund der Konservierungsmaßnahmen eine Reduktion der DNA-Qualität und -Quantität statt. Dies kann zu einem artifiziellen Allelverlust und damit zu einem veränderten Inaktivierungsmuster führen (Cheng et al., 2008 a). Hypothetisch könnte z. B. eine bevorzugte Bindung von Formaldehyd an methylierte DNA zu deren gehäufte Fragmentierung führen. In der PCR unverdauter Proben eines Tumors würde diese Sequenz dann nicht amplifiziert und es würde nur ein Allel, in diesem Fall das nicht methylierte, nachgewiesen, das Gewebe somit als falsch homozygot beurteilt und von der XCIMA ausgeschlossen. Je nach Formaldehydkonzentration, Gewebe und Einwirkzeit könnte diese bevorzugte Bindung bei allen FFPE-Geweben unterschiedlich ausfallen, so dass nicht in allen Proben das methylierte Allel fragmentiert vorläge und somit auch heterozygote Gewebe nachgewiesen werden könnten. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass in der Humanmedizin kein Zusammenhang von FFPE-Gewebe mit einer veränderten erniedrigten Heterozygotierate festgestellt werden konnte (Marshall et al., 1993). Vergleichende Studien bei Hunden und Katzen wären in diesem Zusammenhang dennoch interessant, sind in der Literatur jedoch nicht beschrieben.

Grundsätzlich eignet sich FFPE-Material für den CANARA- und den FELARA-Assay, wenn oben genannte Regeln zur DNA-Extraktion, zum Verdau und zur PCR-Durchführung eingehalten werden. Aufgrund fehlender Studien bei Hund und Katze kann nicht gesagt werden, ob FFPE-Gewebe einen Einfluss auf die Heterozygotie-Problematik hat. Sollte ein derartiger Einfluss vorliegen, würde das den Einsatz dieses Materials in der XCIMA in der vorliegenden Form jedoch deutlich einschränken.

4.4 Vierte Hypothese

Der an kaninen kutanen Histiozytomen erprobte CANARA-Assay und der an Lymphomen erprobte FELARA-Assay können auch bei anderen Tumorentitäten angewendet werden.

In der Humanmedizin hat sich die XCIMA zu einer häufig angewandten Klonalitätsanalyse von Zellen verschiedener Organsysteme entwickelt, sowohl bei hämatopoetischen als auch bei nicht hämatopoetischen Tumoren (Mochizuki et al., 2012 & 2015). Ihre Anwendbarkeit gilt in der Humanmedizin grundsätzlich bei allen heterozygoten Frauen und allen Neoplasien (Mannhalter & Mitterbauer, 1998).

Mochizuki et al. erprobten 2012 die XCIMA des AR-Gens an feline Tumoren verschiedener Entitäten, z. B. Lymphomen, epithelialen Tumoren, verschiedenen Adenokarzinomen, Fibrosarkomen und Mastzelltumoren. 80 % ihrer untersuchten Gewebeproben zeigten ein monoklonales Inaktivierungsmuster, 20 % zeigten ein polyklonales Inaktivierungsmuster, welches sie mutmaßlich als Verunreinigung der Probe mit nicht neoplastischen Zellen interpretierten oder als Abweichung aufgrund abnormer Methylierung der Tumoren. In einer weiteren Studie von Mochizuki et al. wurde 2015 die Klonalität verschiedener kaniner hämatopoetischer Tumoren mit Hilfe der XCIMA des AR-Gens erfolgreich demonstriert. Aus ihren Ergebnissen leiteten sie ab, dass die XCIMA des AR-Gens für eine Vielzahl feline und kaniner proliferativer Erkrankungen angewandt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde das entwickelte CANARA-Assay ebenfalls an verschiedenen Tumorentitäten getestet. Es wurde ausschließlich Probenmaterial von zuvor eindeutig diagnostizierten Tumoren verschiedener Entitäten zur Etablierung des Assays auf Klonalität untersucht. Der XCIMA unterzogen wurden Mammaadenome (n = 11), ein Mammakarzinom (n = 1), Glioblastome (n = 2) und kutane Histiozytome (n = 11) von Hunden sowie Lymphome (n = 9) von Katzen. Bis auf ein vermutlich artifizielles Inaktivierungsmuster eines Lymphoms, fanden sich bei allen Tumoren monoklonale, nicht zufällige Inaktivierungsmuster. Als Kontrollgruppe wurden glanduläre Hyperplasien (n = 3) bei den Hunden und lymphatische Hy-

perplasien (n = 2) bei den Katzen der XCIMA unterzogen. Alle Hyperplasien zeigten polyklonale, zufällige Inaktivierungsmuster.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie oben erwähnter Studien (Mochizuki et al., 2012 & 2015) kann davon ausgegangen werden, dass die XCIMA des AR-Gens auf eine Vielzahl von kaninen und felines Tumorentitäten angewendet werden kann, allerdings ist bei der Interpretation der Ergebnisse immer eine ausführliche Evaluation bzgl. der jeweils spezifischen Tumoreigenschaften und des Ursprungsgewebes notwendig. Insbesondere muss bei epithelialen Tumoren das *Patch-size*-Phänomen beachtet werden.

4.5 Qualitätsprüfung der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse als diagnostischer Test

Für die Beurteilung der Validität und damit der Aussagekraft eines diagnostischen Testverfahrens ist eine systematische Qualitätsprüfung hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität des Testes mit statistischer Auswertung zwingend erforderlich.

Diese Qualitätsprüfung war jedoch nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit. Die niedrigen Fallzahlen der heterozygoten Individuen in dieser Arbeit stellten zudem eine technische Limitierung für eine derartige Prüfung dar. Die vorliegende Arbeit hat einen deskriptiven Charakter und beschreibt den ersten Schritt der Testentwicklung. Ziel war die Etablierung und Adaption zweier XCIMA für die Anwendung an kaninen und felines Tumoren aus FFPE-Material. Durch den Einsatz verschiedener Tumoren aus diesem Material in der XCIMA sollten erste Anhaltspunkte zur generellen Funktionalität dieses Testes für Proben aus archiviertem Material gewonnen werden. Diese Funktionalität konnte mit der vorliegenden Arbeit dargestellt werden.

In einem nächsten Schritt muss die systematische Qualitätsprüfung der XCIMA an deutlich höheren Fallzahlen erfolgen. Dies sollte das Ziel einer zukünftigen Arbeit sein. In dieser Folgearbeit wäre zunächst eine statistische Methoden- und Fallzahlplanung mit erfahrenen Biometrikern ratsam. Hinsichtlich der Sensitivität der XCIMA gälte es dann zu überprüfen, wie viele falsch polyklonale Inaktivierungsmuster ermittelt würden, obwohl alle in der XCIMA untersuchten Tumoren gesichert monoklonal sind. Die Spezifität betreffend müsste der Anteil der falsch monoklonalen Inaktivierungsmuster bei gesichert polyklonalen Proliferationen ermittelt werden. Hierbei sollten für jeden Tumor die jeweils wichtigsten Differentialdiagnosen beleuchtet werden. Für das kanine kutane Histiozytom wäre es beispielsweise sinnvoll, reaktive Histiozytosen oder granulomatöse Entzündungen mittels XCIMA zu untersuchen, für das Lymphom reaktive lymphatische Hyperplasien.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Sowohl das kanine als auch das feline AR-Gen erwiesen sich als geeignete Genloki für die XCIMA. Größter Vorteil dieser Genloki ist das Vorliegen der hoch variablen Regionen mit CAG Wiederholungen in unmittelbarer Nähe zu CpG-Inseln mit enthaltenen methylierten Restriktionsstellen. Dies ermöglicht die Anwendung an fragmentierter DNA. Aufgrund der variablen Anzahl an CAG Wiederholungen stellt das AR-Gen einen der informativsten Marker für die XCIMA bei weiblichen Individuen dar (Diaz-Cano et al., 2001).

Ein weiterer großer Vorteil der XCIMA ist, dass diese Methode ohne Kenntnis tumorspezifischer genetischer oder zytogenetischer Marker den Nachweis der Klonalität erbringen kann und dass sie grundsätzlich bei allen weiblichen (heterozygoten) Individuen und vielen Formen von Neoplasien anwendbar ist (Mannhalter & Mitterbauer, 1998; Mochizuki et al., 2012 & 2015).

Ein Nachteil der Assays ist, dass sie nicht bei männlichen oder homozygoten weiblichen Tieren angewandt werden können. Ein weiterer Nachteil ist die sehr niedrige Heterozygotierate, insbesondere bei den untersuchten Geweben in der vorliegenden Arbeit. Ob hier ein möglicher Zusammenhang mit der Verwendung von FFPE-Material bestehen könnte, müssen zukünftige Studien zeigen. Bei Katzen wurde in allen Studien eine höhere Heterozygotierate als bei Hunden entdeckt, daraus resultiert eine bessere Anwendbarkeit dieses Assays bei Katzen als bei Hunden. Insgesamt gesehen war in der vorliegenden Arbeit die Rate der Heterozygotie bei beiden Spezies zu niedrig, um die entwickelten Assays in dieser Form für die Routinediagnostik kaniner oder feliner Tumoren aus FFPE-Material nutzen zu können. Mit der Verwendung mehrerer Zielsequenzen wird die Anwendbarkeit der XCIMA für die Routinediagnostik jedoch verbessert (Tomita et al., 2019). Zukünftig sind weitere Studien wünschenswert, die die Untersuchung mehrerer Zielsequenzen kombinieren.

Zudem steht die systematische Qualitätsprüfung der XCIMA hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität noch aus und müsste bestenfalls an einem mit mehreren Zielsequenzen erweitertem Assay an höheren Fallzahlen durchgeführt werden. Dies sollte das Vorhaben einer zukünftigen Arbeit sein.

Die Interpretation der Ergebnisse der XCIMA ist aufgrund der Komplexität und häufigen Fehlerquellen der Analyse oft schwierig und stark von der Erfahrung des Interpretierenden abhängig. Die Tumorheterogenität erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Jedes Ergebnis der XCIMA muss im Gesamtzusammenhang mit den jeweils tumorspezifischen Besonderheiten interpretiert werden. Diese Besonderheiten müssen schon bei der Probengewinnung, der Zielauswahl und natürlich bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Insbesondere bei epithelialen Tumoren ist eine umfassende Interpretation der XCIMA-Ergebnisse hinsichtlich des Patch-size-Phänomens notwendig. Zur Vermeidung falscher Diagnosen

müssen klinische, morphologische und bestenfalls immunophänotypische Daten mit in die Beurteilung der Klonalitätsanalyse einfließen. Klonalitätsassays sind nicht als alleinige Tests in der Routinediagnostik geeignet, sondern sie sind eine nützliche Ergänzung zu anderen routinediagnostischen Untersuchungen.

Zukünftig wäre eine Institut-übergreifende Standardisierung von Klonalitätsanalysen in Hinblick auf Labortechniken wie beispielsweise der Probengewinnung und Aufarbeitung, der Analyseregeln und der Entwicklung standardisierter Primer-Sets sinnvoll, um eine Basis für einheitliche Interpretationsrichtlinien zu erhalten. In der Humanmedizin wurde diesbezüglich 1994 das Forschungsprogramm für Biomedizin und Gesundheitswesen (Biomed 2) ins Leben gerufen, was sicherlich dazu beigetragen hat, dass sich die Klonalitätsanalyse in der Humanmedizin zu einer effektiven, standardisierten und weit akzeptierten Untersuchungsmethode entwickelt hat. Gerade in der Veterinärmedizin wäre ein solches Forschungsprogramm ebenfalls wünschenswert, besonders aufgrund der Tatsache, dass Klonalitätsanalysen speziesspezifisch sind. (Keller et al., 2016)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit entwickelten Klonalitätsassays für einen erfahrenen Diagnostiker gute Werkzeuge zur Ergänzung der routinemäßigen Tumordiagnostik bei unklaren Befunden sein können. Die Methode ist grundsätzlich bei vielen Formen von Neoplasien anwendbar. Jedes Ergebnis muss in Bezug auf spezielle Tumoreigenschaften und Interpretationsfehler evaluiert und im Gesamtzusammenhang mit anderen diagnostischen Parametern ausgewertet werden. Der größte Nachteil dieses Testverfahrens ist die niedrige Sensitivität bzgl. der Heterozygotierate, die den Einsatz in der vorliegenden Form für die Routinediagnostik bei Hunden und Katzen nicht zulässt. Zukünftig müssen weitere verbesserte Klonalitätsassays entwickelt werden. Dann könnte sich die XCIMA auch in der Veterinärmedizin zu einer effektiven Untersuchungsmethode entwickeln, die dazu beiträgt, einen Tumor in seinem molekularen Ganzen zu verstehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die meisten Tumoren haben einen monoklonalen Ursprung. Zur Nutzung dieser Eigenschaft von Tumoren für die Diagnostik wurden in der Veterinärmedizin bereits zahlreiche Techniken entwickelt. Bis heute gibt es jedoch keinen für die Routinediagnostik einsetzbaren Klonalitätstest für nicht lymphoide Tumoren. Eine Methode zur Analyse der Klonalität von Tumoren besteht in der Untersuchung des Inaktivierungsmusters von X-chromosomalen Genloki weiblicher Individuen. Die theoretische Grundlage für die X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse bildet die Lyon-Hypothese, welche besagt, dass in normalen somatischen Zellen eines weiblichen Individuums immer eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert vorliegt. Die Inaktivierung erfolgt zu einem sehr frühen embryonalen Zeitpunkt. In jeder embryonalen Zelle wird nach dem Zufallsprinzip bestimmt, ob das väterliche oder das mütterliche X-Chromosom inaktiviert wird. Diese Inaktivierung wird dann stabil auf alle Tochterzellen weitergegeben. Damit besteht jedes weibliche ausdifferenzierte Gewebe aus einem Mosaik von Zellen, in denen jeweils unterschiedliche X-Chromosomen inaktiviert vorliegen. Bei einem monoklonalen Tumor hingegen liegt in jeder Zelle das gleiche X-Chromosom inaktiviert vor. Diese klonale Inaktivierung gilt es in der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse an ausgewählten Genloki nachzuweisen. Eine unverzichtbare Voraussetzung dafür ist die Heterozygotie der Allele für einen leicht zu findenden Polymorphismus.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine kumulative Dissertation, die auf zwei Publikationen beruht. Beide Texte wurden in englischsprachigen, internationalen Fachzeitschriften mit Gutachtersystem publiziert und beschreiben die Etablierung zweier X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analysen für die Anwendung bei kaninen und felines Tumoren aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Material.

Als Zielsequenzen für die X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analysen wurden polymorphe Mikrosatelliten des Androgenrezeptor-Gens gewählt. Zur Gewinnung erster Anhaltspunkte bzgl. der generellen Funktionalität der entwickelten Assays wurden diese an verschiedenen kaninen und felines archivierten Proliferationen getestet. Der für den Hund entwickelte Assay wurde schwerpunktmäßig an kutanen Histiocyten ($n = 11$) und zudem an Mammaadenomen ($n = 11$), einem Mammakarzinom ($n = 1$), Glioblastomen ($n = 2$) sowie glandulären Hyperplasien ($n = 3$) getestet. Der für die Katze entwickelte Assay wurde an Lymphomen ($n = 9$) und lymphatischen Hyperplasien ($n = 2$) geprüft. Sowohl das kanine als auch das feline Androgenrezeptor-Gen erwiesen sich als geeignete Genloki für diese Art von Klonalitätsanalyse. Durch die Anwendung der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse auf polymorphe Regionen des Androgenrezeptor-Gens oben genannter Tumoren konnten bei allen Tumoren, mit Ausnahme eines Lymphoms, nicht zufällige monoklonale Inaktivierungsmuster

detektiert werden und insbesondere bei den kaninen kutanen Histiozytomen und den felines Lymphomen nach ausführlicher Interpretation der Ergebnisse Rückschlüsse auf die Monoklonalität dieser Tumoren gezogen werden. Nur bei einem felines Lymphom stellte sich ein sehr wahrscheinlich artifizielles, falsch polyklonales Inaktivierungsmuster dar. Alle in der Arbeit untersuchten glandulären und lymphatischen Hyperplasien erwiesen sich im Gegensatz zu den Tumoren als polyklonal. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit die grundsätzliche Funktionalität der Assays an den untersuchten archivierten Tumoren dargestellt werden.

Diese Arbeit beschreibt den ersten Schritt der Testentwicklung. In einem nächsten Schritt müssen die entwickelten X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analysen einer systematischen Qualitätsprüfung hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität unterzogen werden. Diese Qualitätsprüfung war jedoch nicht das Ziel der vorliegenden deskriptiven Arbeit, sondern muss in einer Folgearbeit an deutlich höheren Fallzahlen durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit stellten niedrige Fallzahlen heterozygoter Individuen eine technische Limitierung für eine derartige Prüfung dar.

Bei Hunden und Katzen ist die Heterozygotie-Rate am Androgenrezeptor-Genlocus im Vergleich zum Menschen allgemein niedriger. Dies wirkt sich nachteilig auf die Anwendbarkeit kaniner und felines Gewebe in der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster-Analyse aus. In der vorliegenden Arbeit wurde eine besonders niedrige Heterozygotie-Rate bei Hunden (19 %) und bei Katzen (37,5%) festgestellt. Ein Zusammenhang mit dem Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Probenmaterial wird vermutet. Zur Verbesserung der Anwendbarkeit sollten zukünftig erweiterte Assays entwickelt werden, die mehr als einen polymorphen Genlocus untersuchen und damit eine höhere Heterozygotie-Rate ermöglichen.

Insgesamt gesehen, können die in dieser Arbeit entwickelten Klonalitätsassays für einen erfahrenen Diagnostiker gute Werkzeuge zur Ergänzung der routinemäßigen Tumordiagnostik bei unklaren Befunden sein. Die Methode sollte zukünftig allerdings durch weitere Zielsequenzen in ihrer Anwendbarkeit verbessert sowie einer Qualitätsprüfung unterzogen werden. Grundsätzlich ist sie bei vielen Formen von Neoplasien weiblicher Tiere anwendbar. Jedes Ergebnis muss jedoch in Bezug auf spezielle Tumoreigenschaften (insbesondere im Hinblick auf Tumorheterogenität) und Interpretationsfehler evaluiert und im Gesamtzusammenhang mit anderen diagnostischen Parametern ausgewertet werden.

6 SUMMERY

Establishment of X-chromosome inactivation pattern analysis of polymorphic microsatellites of the androgen receptor gene for clonality detection of various canine and feline tumours from archived material

Nadine Maria Farwick

Most tumours have a monoclonal origin. Numerous techniques have already been developed in veterinary medicine to exploit this characteristic of tumours for diagnostic purposes. To date, however, there is no clonality test for non-lymphoid tumours that can be used for routine diagnostics. One method to analyse the clonality of tumours consists in the investigation of the inactivation pattern of X-linked gene loci of female individuals. The theoretical basis for the X-chromosome inactivation pattern analysis is the Lyon hypothesis, which states that in normal somatic cells of a female individual there is always one of the two X-chromosomes inactivated. The inactivation occurs at a very early embryonic stage. In each embryonic cell it is determined at random whether the paternal or maternal X-chromosome is inactivated. This inactivation is then passed on stably to all daughter cells. Thus, every female differentiated tissue consists of a mosaic of cells in which different X-chromosomes are inactivated. In a monoclonal tumour, on the other hand, the same X-chromosome is present in inactivated form in every cell. This clonal inactivation has to be detected in the X-chromosome inactivation pattern analysis on selected gene loci. An indispensable prerequisite for this is the heterozygosity of the alleles for an easily found polymorphism.

The present work is a cumulative dissertation based on two publications. Both papers have been published in international peer-reviewed journals and describe the establishment of two X-chromosome inactivation pattern analyses for application to canine and feline tumors of formalin-fixed and paraffin-embedded material.

Polymorphic microsatellites of the androgen receptor gene were chosen as target sequences for the X-chromosome inactivation pattern analyses. In order to gain first clues regarding the general functionality of the developed assays, they were tested on different canine and feline archived proliferations. The assay developed for the dog was mainly tested on cutaneous histiocytomas (n = 11) and also on mammary adenomas (n = 11), a mammary carcinoma (n = 1), glioblastomas (n = 2) and glandular hyperplasias (n = 3). The assay developed for cats was tested on lymphomas (n = 9) and lymphatic hyperplasias (n = 2). Both the canine and the feline androgen receptor gene were found to be suitable gene loci for this type of clonality analysis. By applying the X-chromosome inactivation pattern analysis to polymorphic regions

of the androgen receptor gene of the above-mentioned tumors, non-random monoclonal inactivation patterns could be detected in all tumors except one lymphoma. Especially in canine cutaneous histiocytomas and feline lymphomas, conclusions on the monoclonality of these tumors could be drawn after detailed interpretation of the results. Only in the case of one feline lymphoma there was an artificial, false-polyclonal inactivation pattern very likely. All glandular and lymphatic hyperplasias investigated in the study were polyclonal in contrast to the tumors. Thus, the present study was able to demonstrate the basic functionality of the assays on the investigated archived tumors.

This thesis describes the first step of the test development. In the next step, the developed X-chromosome inactivation pattern analyses should be subjected to a systematic quality check with regard to their sensitivity and specificity. However, this quality test was not the aim of the present descriptive work, but has to be carried out in a follow-up work on significantly higher numbers of cases. In the present study, low case numbers of heterozygous individuals represented a technical limitation for such a test.

In dogs and cats the heterozygous rate at the androgen receptor gene locus is generally lower compared to humans. This adversely affects the applicability of canine and feline tissues in X-chromosome inactivation pattern analysis. In the present study a particularly low heterozygosity rate was found in dogs (19%) and in cats (37.5%). An association with formalin-fixed paraffin-embedded sample material is suspected. To improve the applicability, extended assays should be developed in the future, which examine more than one polymorphic gene locus and thus enable a higher heterozygosity rate.

All in all, the clonality assays developed in this work can be good tools for an experienced diagnostician to supplement routine tumor diagnostics in case of unclear findings. In the future, however, the method should be improved in its applicability through the addition of further target sequences and be subject to quality control. In principle, it can be used for many forms of neoplasia of female animals. However, each result must be evaluated with regard to specific tumour characteristics (especially with regard to tumour heterogeneity) and interpretation errors and evaluated in the overall context of other diagnostic parameters.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abkowitz, J. L., Taboada, M., Shelton, G. H., Catlin S. N., Gutter, P. & Kiklevich, J. V. (1998). An X chromosome gene regulates hematopoietic stem cell kinetics. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95 (7): 3862 - 3866.
- Alaibac, M., Daga, A., Harms, G., Morris, J., Yu, R. C., Zwingerberger, K. & Chu, A. C. (1993). Molecular analysis of the gamma delta T-cell receptor repertoire in normal human skin and in oriental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Dermatology*, 2 (3): 106 - 112.
- Allen, R. C., Zoghbi, H. Y., Moseley, A. B., Rosenblatt, H. M. & Belmont, J. W. (1992). Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *American Journal of Human Genetics*, 51 (6): 1229 - 1239.
- American Psychological Association (2020). *Publication Manual of the American Psychological Association*. 7. Auflage. Washington, DC: Autor.
- Arnemann, J. (2019). DNA-Methylierung. In: Gressner, A. M. & Arndt, T. (Hrsg.): *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer. 718.
- Baines, S. J., McInnes, E. F. & McConnel, I. (2008). E-cadherin expression in canine cutaneous histiocytomas. *Veterinary Record*, 162 (16): 509 - 513.
- Banelli, B., Casciano, I., Di Vinci, A., Gatteschi, B., Levaggi, A., Carli, F., Bighin, C., Salvi, S., Allemanni, G., Ghiorzo, P., Pronzato, P., Venturini, M., Romani, M. & Del Mastro, L. (2010). Pathological and molecular characteristics distinguishing contralateral metastatic from new primary breast cancer. *Annals of Oncology*, 21 (6): 1237 - 1242.
- Bertagnolli, A. C., Soares, P., van Asch, B., Amorim, A., Cirnes, L., Maximo, V. & Cassali, G. D. (2009). An assessment of the clonality of the components of canine mixed mammary tumours by mitochondrial DNA analysis. *The Veterinary Journal*, 182 (2): 269 - 274.
- Bonnet, D. & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3 (7): 730 - 737.
- Brady, S. P., Magro, C. M., Diaz-Cano, S. J. & Wolfe, H. J. (1999). Analysis of clonality of atypical cutaneous lymphoid infiltrates associated with drug therapy by PCR/DGGE. *Human Pathology*, 30 (2): 130 - 136.

- Burnett, R. C., Vernau, W., Modiano, J. F., Olver, C. S., Moore, P. F. & Avery, A. C. (2003). Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology*, 40 (1): 32 - 41.
- Busque, L., Mio, R., Mattioli, J., Brais, E., Blais, N., Lalonde, Y., Maragh, M. & Gilliland, D. G. (1996). Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*, 88 (1): 59 - 65.
- Busque, L., Zhu, J., DeHart, D., Griffith, B., Willman, C., Carrol, R., Black, P. M. & Gilliland, D.G. (1994). An expression based clonality assay at the human androgen receptor locus (HUMARA) on chromosome X. *Nucleic Acids Research*, 22 (4): 697 - 698.
- Calabrese, P., Tavaré, S. & Shibata, D. (2004). Pretumor progression: clonal evolution of human stem cell populations. *The American Journal of Pathology*, 164 (4): 1337 - 1346.
- Carrel, L. & Willard, H. F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 434: 400 - 404.
- Casey, J. W., Roach, A., Mullins, J. I., Burck, K. B., Nicolson, M. O., Gardner, M. B. & Davidson, N. (1981). The U3 portion of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78: 7778 - 7782.
- Chamberlain, N. L., Driver, E. D. & Miesfeld, R. L. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Research*, 22 (15): 3181 - 3186.
- Chen, G. L. & Prchal, J. T. (2007). X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood*, 110 (5): 1411 - 1419.
- Cheng, L., Zhang, S., Jones, T. D. & Blue, D. E. (2008a). Clonality analysis in modern oncology and surgical pathology. In: Cheng, L. & Zhang, D. Y. (Hrsg.). *Molecular genetic pathology*. Totowa, New Jersey: Humana Press. 261ff.
- Cheng, L., MacLennan, G. T., Zhang, S., Wang, M., Zhou, M., Tan, P. - H., Foster, S, Lopez-Beltran, A. & Montironi, R. (2008b). Evidence for polyclonal origin of multifocal clear cell renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 14 (24): 8087 - 8093.
- Chiu, A., Czader, M., Cheng, L., Hasserjian, R. P., Wang, M., Bhagavathi, S., Hyjek, E. M., Al-Ahmadie, H., Knowles, D. M. & Orazi, A. (2011). Clonal X-chromosome inactivation suggests that splenic cord capillary hemangioma is a true neoplasm and not a subtype of splenic hamartoma. *Modern Pathology*, 24 (1): 108 - 116.
- Christensen, B. C., Andres Houseman, E., Marsit, C. J., Zheng, S., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., Nelson, H. H., Karagas, M. R., Padbury, J. F., Bueno, R., Sugarbaker, D. J., Ru-Fang, Y., Wiencke, J. K. & Kelsey, K. T. (2009). Aging and environmental ex-

- posures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLOS Genetics*, 5 (8): e1000602.
- Chu, E. H. Y., Boehnke, M., Hanash, S. M., Kuick, R. D., Lamb, B. J., Neel, J. V., Niezgoda, W., Pivrotto, S. & Sundling, G. (1988). Estimation of mutation rates based on the analysis of polypeptide constituents of cultured human lymphoblastoid cells. *Genetics*, 119: 693 – 703.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. & Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, 66 (19): S. 9339 - 9334.
- Cockerell, G. L. & Slauson, D. O. (1979). Patterns of lymphoid infiltrate in the canine cutaneous histiocytoma. *Journal of Comparative Pathology*, 89 (2): 193 - 203.
- Coomer, A. R. & Liptack, J. M. (2008). Canine histiocytic diseases. *Compendium of Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 30: 202 - 216.
- Costa, F. F., Le Blanc, K. & Brodin, B. (2007). Cancer/Testis antigens, stem cells and cancer. *Stem Cells*, 25: 707 - 711.
- Creste, S., Tulmann Neto, A. & Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299 - 306.
- Davey, R. A. & Grossmann, M. (2016). Androgen receptor structure, function and biology: From Bench to Bedside. *The Clinical Biochemist Reviews*, 37 (1): 3 – 15.
- Delcour, N. M., Klopfleisch, R., Gruber, A. D. & Weiss, A. T. A. (2013). Canine cutaneous histiocytomas are clonal lesions as defined by X-linked clonality testing. *Journal of Comparative Pathology*, 149 (2 - 3): 192 - 198.
- Diaz-Cano, S. J. (2000). Designing a molecular analysis of clonality in tumours. *The Journal of Pathology*, 191 (4): 343 - 344.
- Diaz-Cano, S. J., Blanes, A. & Wolfe, H. J. (2001). PCR techniques for clonality assays. *Diagnostic Molecular Pathology*, 10 (1): 24 - 33.
- Farwick, N. M., Klopfleisch, R., Gruber, A. D. & Weiss, A. T. A. (2017). Microsatellites within the feline androgenreceptor are suitable for X chromosome-linked clonality testing in archival material. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19 (4): 454 - 460
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61 (5): 759 - 767.
- Fialkow, P. J. (1979). Clonal origin of human tumors. *Annual Review of Medicine*, 30: 135 – 143.
- Fialkow, P. J., Jackson, C. E., Block, M. A. & Greenawald, K. A. (1977). Multicellular origin of parathyroid „adenomas“. *The New England Journal of Medicine*, 297: 696 - 698.

- Fietz, D., Geyer, J., Gromoll, J., Kliesch, S. & Bergmann, M. (2010). CAG repeat of human androgen receptor - a marker for male infertility? *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 10 - 11.
- Fietz, D., Handte, K., Geyer, J. & Hose, J. (2009). Somatic mosaicism of androgen receptor at the level of Sertoli cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 44: 9.
- Fulmer, A.K. & Mauldin, G. E. (2007). Canine histiocytic neoplasia: an overview. *The Canadian Veterinary Journal*, 48 (10): 1041 – 1050.
- Furlan, D., Cerutti, R., Genasetti, A., Pelosi, G., Uccella, S., La Rosa, S. & Capelle, C. (2003). Microallelotyping defines the monoclonal or the polyclonal origin of mixed and collision endocrine-exocrine tumors of the gut. *Laboratory investigation*, 83 (7): 963 - 971.
- Gale, R. E., Wheadon, H., Boulos, P. & Linch, D. C. (1994). Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns. *Blood*, 83 (10): 2899 - 2905.
- Gamlem, H., Nordstoga, K. & Glattre, E. (2008). Canine neoplasia - introductory paper. *APMIS. Supplement* (125): 5 - 18.
- Gann, P. H., Hennekens, C. H., Ma, J., Longcope, C. & Stampfer, M. J. (1996). Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institut*, 88 (16): 1118 – 1126.
- Gao, T., Marcellini, M. & McPhaul, M. J. (1996). Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 59 (1): 9 – 20.
- Garcia, S. B., Novelli, M. & Wright, N. A. (2000). The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours. *International Journal of Experimental Pathology*, 81: 89 - 116.
- Gazzola, A., Mannu, C., Rossi, M., Laginestra, M. A., Sapienza, M. R., Fuligni, F., Etebari, M., Melle, F., Sabattini, E., Agostinelli, C., Bacci, F., Sagramoso Sacchetti, C. A., Pileri, S. A. & Piccaluga, P. P. (2014). The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Therapeutic Advances in Hematology*, 5 (2): 35 - 47.
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., ... & Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine*, 366 (10): 883 – 892.
- Gerlinger, M., Horswell, S., Larkin, J., Rowan, A. J., Salm, M. P., Varela, I., Fisher, R., McGranahan, N., Matthews, N., Santos, C. R., Martinez, P., Phillimore, B., Begum, S., Rabinowitz, A., Spencer-Dene, B., Gulati, S., Bates, P. A., Stamp, G., Pickering, L., ... & Swanton, C. (2014). Genomic architecture and evolution of clear cell renal

- cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature Genetics*, 46 (3): 225 – 233.
- Geyer, F. C., Weigelt, B., Natrajan, R., Lambros, M. B., de Biase, D., Vatcheva, R., Savage, K, Mackay, A., Ashworth, A. & Reis-Filho, J. S (2009). Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas. *Journal of Pathology*, 220 (5): 562 - 573.
- Gil, J., Stembalska, A., Pesz, K .A. & Sasiadek, M. M. (2008). Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *Journal of Applied Genetics*, 49 (2): 193 - 199.
- Gilbert, M. T., Haselkorn, T., Bunce, M., Sanchez, J. J., Lucas, S. B., Jewell, L. D., Van Marck, E. & Worobey, M. (2007). The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues - which methods are useful when? *PLoS One*, 2 (6): e537.
- Gilliland, D. G., Blanchard, K. L., Levy, J., Perrin, S. & Bunn, H. F. (1991). Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (15): 6848 - 6852.
- Ginn, P. E., Mansell, J. E. K. L. & Rakich, P. M. (2007). Skin and appendages. In: Maxie, M. G. (Hrsg.). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals*. 5. Auflage. Philadelphia: Saunders Elsevier. 553 – 782.
- Going, J. J., Abd El-Monem, H. M. & Craft, J. A. (2001). Clonal origins of human breast cancer. *Journal of Pathology*, 194: 406 - 412.
- Going, J. J. (2003). Epithelial carcinogenesis: challenging monoclonality. *Journal of Pathology*, 200 (1): 1 - 3.
- Gong, L., Li, Y. H., Su, Q., Chu, X. & Zhang, W. (2010). Clonality of nodular lesions in liver cirrhosis and chromosomal abnormalities in monoclonal nodules of altered hepatocytes. *Histopathology*, 56 (5): 589 - 599.
- Gong, L., Zhang, W. D., Liu, X. Y., Han, X. J., Yao, L., Zhu, S. J., Lan, M., Li, Y. - H. & Zhang, W. (2010). Clonal status and clinicopathological observation of cervical minimal deviation adenocarcinoma. *Diagnostic Pathology*, 5: 25.
- Graham, T. A., McDonald, S. A. & Wright, N. A. (2011). Field cancerization in the GI tract. *Future Oncology*, 7 (8): 981 - 993.
- Guo, W., Lasky, J. L. & Wu, H. (2006). Cancer Stem Cells. *Pedriatic Research*, 59: 59 - 64.
- Helmbert, A. (2000 - 2019). Krebsentstehung. Scriptum. Version 4.3. Zuletzt abgerufen am 20. März 2020, von <http://www.helmbert.at/krebsentstehung.htm>
- Hendriks, R. W., Chen, Z. Y., Hinds, H., Schuurman, R. K. & Craig, I. W. (1992). An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the monoamine oxidase A gene. *Human Molecular Genetics*, 1 (3): 187 - 194.

- Henrich, M., Hecht, W., Weiss, A. T. & Reinacher, M. (2009). A new subgroup of immunoglobulin heavy chain variable region genes for the assessment of clonality in feline B-cell lymphomas. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130 (1-2): 59 - 69.
- Hörbe, A. (2005). *Klonalitätsanalyse mittels PCR-Amplifikation X-chromosomal-gebundener Gene (MAOA und HUMARA) am Beispiel von Leiomyomen des Uterus und deren Anwendung auf das Krankheitsbild des benignen metastasierenden Leiomyoms zur Klärung dessen Pathogenese* (Dissertation). Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Medizinische Fakultät.
- Horton, J. R., Yang, J., Zhang, X., Petronzio, T., Fomenkov, A., Wilson, G. G., Roberts, R. J. & Cheng, X. (2020). Structure of HhaI endonuclease with cognate DNA at an atomic resolution of 1.0 Å. *Nucleic acids research*, 48 (3): 1466 – 1478.
- Hsing, A. W., Gao, Y. T., Wu, G., Wang, X., Deng, J., Chen, Y. L., Sesterhenn, I. A., Mostofi, F. K., Benichou, J. & Chang, C. (2000). Polymorphic CAG and GGN repeat length in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case control study in China. *Cancer Research*, 60 (18): 5111 – 5116.
- Hügel, A. & Wernert, N. (1999). Loss of heterozygosity (LOH), malignancy grade and clonality in microdissected prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 79 (3 – 4): 551 – 557.
- Ishiguro, N., Matsui, T. & Shinagawa, M. (1994a). Differentiation analysis of bovine T-lymphosarcoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41: 1 – 17.
- Ishiguro, N., Shinagawa, T., Matsui, T. & Shinagawa, M. (1994b). Putative bovine B cell lineage tumor in sporadic bovine leukosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 42: 185 – 197.
- Jenkins, G. J. S., Doak, S. H., Griffiths, A., Toffazzal, N., Shah, V., Baxter, J. N., Parry, J. M. (2003). Early p53 mutations in nondysplastic Barrett's tissue detected by the restriction site mutation (RSM) methodology. *British Journal of Cancer*, 88: 1271 - 1276.
- Jevremovic, D. & Viswanatha, D. S. (2009). Molecular diagnosis of hematopoietic and lymphoid neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23 (4): 903 – 933.
- Jones, P. A. & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Natur Reviews Genetics*, 3 (6): 415 – 428.
- Jovanovic, L., Delahunt, B., McIver, B., Eberhardt, N. L. & Grebe, S. K. (2003). Thyroid gland clonality revisited: The embryonal patch size of the normal human thyroid gland is very large, suggesting X-chromosome inactivation tumor clonality studies of thyroid tumors have to be interpreted with caution. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88 (7): 3284 - 3291.
- Kaim, U., Moritz, A., Failing, K. & Baumgartner, W. (2006). The regression of a canine Langerhans cell tumour is associated with increased expression of IL-2, TNF-alpha, IFN-gamma and iNOS mRNA. *Immunology*, 118: 472 – 482.

- Keller, S. M., Vernau, W. & Moore, P. F. (2016). Clonality testing in veterinary medicine: A review with diagnostic guidelines. *Veterinary Pathology*, 53 (4): 711 - 725.
- Kipar, A., Baumgartner, W., Kremmer, E., Frese, K. & Weiss, E. (1998). Expression of major histocompatibility complex class II antigen in neoplastic cells of canine cutaneous histiocytoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 62: 1 – 13.
- Kisseberth, W. C. & Sandgren, E. P. (2004). Polyclonal development of mouse mammary preneoplastic nodules. *Cancer Research*, 64 (3): 857 - 863.
- Knudson, A. G., Jr. (1985). Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research*, 45 (4): 1437 - 1443.
- Kuiper, G. G., Faber, P. W., van Rooij, H. C., van der Korput, J. A., Ris-Stalpers, C., Klaassen, P., Trapman, J. & Brinkmann, A. O. (1989). Structural organization of the human androgen receptor gene. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2 (3): R1 – R4.
- Labor für klinische Diagnostik (2008, Juli). Histozytär-proliferative Erkrankungen bei Hund und Katze. In: Laboklin aktuell. Zuletzt abgerufen am 20. März 2020, von <https://laboklin.com/de/laboklin-aktuell/newsdetails/article/histiozytaer-proliferative-erkrankungen-bei-hund-und-katze/>
- Lai, C. L., L'Eplattenier, H., van den Ham, R., Verseijden, F., Jagtenberg, A., Mol, J. A. & Teske, E. (2008). Androgen receptor CAG repeat polymorphisms in canine prostate cancer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22 (6): 1380 - 1384.
- Leeb, M. & Wutz, A. (2010). Mechanistic concepts in X inactivation underlying dosage compensation in mammals. *Heredity*, 105 (1): 64 - 70.
- Leeb, M. & Wutz, A. (2012). Establishment of epigenetic patterns in development. *Chromosoma*, 121 (3): 251 – 262.
- Leedham, S. J. & Wright, N. A. (2008). Human tumour clonality assessment - flawed but necessary. *The Journal of Pathology*, 215 (4): 351 - 354.
- Levesque, K. S., Bonham, L. & Levy, L. S. (1990). flvi-1, a common integration domain of feline leukemia virus in naturally occurring lymphomas of a particular type. *Journal of Virology*, 64: 3455 – 3462.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F. & Simeone D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research*, 67 (3): 1030 - 1037.
- Li, E., Beard, C. & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366: 362 – 365.
- Lochhead, P., Chan, A. T., Nishihara, R., Fuchs, C. S., Beck, A. H., Giovannucci, E., Ogino, S. (2015). Etiologic field effect: Reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. *Modern Pathology*, 28 (1): 14 – 29.

- Louwerens, M., London, C. A., Pedersen, N. C. & Lyons, L. A. (2005). Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19 (3): 329 - 335.
- Lu, B., Smock, S. L., Castleberry, T. A. & Owen, T. A. (2001). Molecular cloning and functional characterization of the canine androgen receptor. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 226 (1-2): 129 - 40.
- Magro, C. M., Crowson, A. N., Kovatich, A. J. & Burns, F. (2003). Drug-induced reversible lymphoid dyscrasia: a clonal lymphomatoid dermatitis of memory and activated T cells. *Human Pathology*, 34 (2): 119 - 129.
- Mahe, E., Pugh, T. J. & Kamel-Reid, S. (2018). T cell clonality: past, present and future. *Journal of Clinical Pathology*, 71 (3): 195 - 200.
- Mannhalter, C. & Mitterbauer, G. (1998). Analysis of clonal cell growth using X-chromosome inactivation patterns. *Onkologie*, 21 (5): 380 - 386.
- Marchal, T., Dezutter-Dambuyant, C., Fournel, C., Magnol, J. P. & Schmitt, D. (1995). Immunophenotypic and ultrastructural evidence of the Langerhans cell origin of the canine cutaneous histiocytoma. *Acta Anatomica*, 153 (3): 189 - 202.
- Marshal, R. D., Lester, S. C. & Sklar, J. (1993). Clonal analysis by study of X chromosome inactivation in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Cancer Research*, 53 (19): 4676 - 4679.
- Marusyk, A. & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1805 (1): 105 - 117.
- McDonald, H. L., Gascoyne, R. D., Horsman, D. & Brown, C. J. (2000). Involvement of the X chromosome in non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 28 (3): 246 - 257.
- McNiel, E. A., Griffin, K. L., Mellett, A. M., Madrill, N. J. & Mickelson, J. R. (2004). Microsatellite instability in canine mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (5): 1034 - 40.
- Merad, M., Ginhoux, F. & Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 8 (12): 935 - 947.
- Merrit, A. J., Gould, K. A. & Dove, W. F. (1997). Polyklonal structure of intestinal adenomas in ApcMin/+ mice with concomitant loss of Apc+ from all tumor lineages. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94: 13927 - 13931.
- Minks, J., Robinson, W. P. & Brown, C. J. (2008). A skewed view of X chromosome inactivation. *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (1): 20 - 23.

- Mochizuki, H., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2012). X-chromosome inactivation pattern analysis for the assessment of cell clonality in cats. *Veterinary Pathology*, 49 (6): 963 – 970.
- Mochizuki, H., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2015). Demonstration of the cell clonality in canine hematopoietic tumors by X-chromosome inactivation pattern analysis. *Veterinary Pathology*, 52 (1): 61 - 69.
- Momoi, Y., Nagase, M., Okamoto, Y., Okuda, M., Sasaki, N., Watari, T., Goitsuka, R, Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (1993). Rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in canine lymphoma/leukemia cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 55: 775 – 780.
- Moore, P. F. (2008). Immunological concepts applied to pathologic diagnosis of proliferative diseases of the immune system. *Cancer Therapie*, 6: 263 - 270.
- Moore, P. F. (2012). Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Veterinary Pathology*, 49 (4): 658 - 668.
- Moore, P. F. (2014). A review of histiocytic diseases of dogs and cats. *Veterinary Pathology*, 51 (1): 167 - 84.
- Moore, P. F., Schrenzel, M. D., Affolter, V. K., Olivry, T. & Naydan, D. (1996). Canine cutaneous histiocytoma is an epidermotropic langerhans cell histiocytosis that express CD1 and specific beta(2)-integrin molecules. *The American Journal of Pathology*, 148 (5): 1699 - 1708.
- Moore, P. F., Woo, J. C., Vernau, W., Kosten, S. & Graham, P. S. (2005). Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106 (3 - 4): 167 - 178.
- Mossner, M., Nolte, F., Hütter, G., Reins, J., Klaumünzer, M., Nowak, V., Obländer, J., Ackermann, K., Will, S., Röhl, H., Neumann, U., Neumann, M., Hopfer, O., Baldus, C. D., Hofmann, W. - K. & Nowak, D. (2013). Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by pyrosequencing based transcriptional clonality assay. *Journal of Medical Genetics*, 50: 108 – 117.
- Müllauer, L. (2017, 25. Mai). Tumorheterogenität, was ist das wirklich? In: Universimed - Medizin im Fokus. Zuletzt abgerufen am 20. März 2020, von <https://ch.universimed.com/fachthemen/8619>
- Müllauer, L. (2019, 30. Mai). „DNA mismatch repair“ und Mikrosatelliteninstabilität: Testmethoden. In: Universimed - Medizin im Fokus. Zuletzt abgerufen am 20. März 2020, von <https://ch.universimed.com/fach-themen/1000002189>
- Müller, N., Wurtinger, G., Schwens, C. & Moritz, A. (2015). Das feline tracheale Lymphom. *Kleintier.konkret*, 18 (03): 22 – 27.

- Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A. & Weiss, R. A. (2006). Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, 126 (3): 477 - 487.
- NIH Stem Cell Information Home Page (2016). Stem Cell Basics IV. In: *Stem Cell Information*. [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. Zuletzt abgerufen am 20. März 2020, von <https://stemcells.nih.gov/info/ba-sics/4.htm> (zuletzt abgerufen am 20.03.2020)
- Novelli, M., Cossu, A., Oukrif, D., Quaglia, A., Lakhani, S., Poulosom, R., Sasieni, P., Carta, P., Contini, M., Pasca, A., Palmieri, G., Bodmer, W. & Tanda, F. (2003). X-inactivation patch size in human female tissue confounds the assessment of tumor clonality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (6): 3311 - 3314.
- Nowacka-Woszuik, J. & Switonski, M. (2010). Variability of CAG tandem repeats in exon 1 of the androgen receptor gene is not related with dog intersexuality. *Animal Reproduction Science*, 117 (3 - 4): 308 - 313.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194 (4260): 23 - 28.
- Oller, A. R., Rastogi, P., Morgenthaler, S. & Thilly, W. G. (1989). A statistical model to estimate variance in long term-low dose mutation assays: testing of the model in a human lymphoblastoid mutation assay. *Mutation Research*, 216: 149 - 161.
- Özsoy, S. Y. & Atalay Vural, S. (2009). Pathological findings in intracranial tumours in dogs: 13 cases. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160 (4): 192-196.
- Paiss, T., Wöhr, G., Hautmann, R. E., Mattfeld, T., Müller, M., Haeussler, J. & Vogel, W. (2002). Some tumors of the bladder are polyclonal in origin. *The Journal of Urology*, 167 (2): 718 - 723.
- Pan, B., Li, R., Chen, Y., Tang, Q., Wu, W., Chen, L., Lu, C., Pan, F., Ding H., Xia, Y., Hu, L., Chen, D., Sha, J & Wang, X. (2016). Genetic association between androgen receptor gene CAG repeat length polymorphism and male infertility: A meta analysis. *Medicine (Baltimore)*, 95 (10): e2878.
- Park, T. W. & Simon, M. (2004). Molekulare Grundmechanismen in der Onkogenese. *Der Gynäkologe*, 37 (3): 196 - 202.
- Parsons, B. L. (2008). Many different tumor types have polyclonal tumor origin: evidence and implications. *Mutation Research*, 659 (3): 232 - 247.
- Parsons, B. L. (2018). Multiclonal tumor origin: Evidence and implications. *Mutation Research*, 777: 1 - 18
- Peng, H., Du, M., Diss, T. C., Isaacson, P. G. & Pan, L. (1997). Clonality analysis in tumours of women by PCR amplification of X-linked genes. *Journal of Pathology*, 181: 223 - 227.

- Perren, A., Roth, J., Muletta-Feurer, S., Saremaslani, P., Speel, E. J., Heitz, P. U. & Komminoth, P. (1998). Clonal analysis of sporadic pancreatic endocrine tumours. *The Journal of Pathology*, 186: 363 - 371.
- Plenge, R. M., Hendrich, B. D., Schwartz, C., Arena, J. F., Naumova, A., Sapienza, C., Winter, R. M. & Willard, H. F. (1997). A promoter mutation in the Xist gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nature Genetics*, 17 (3): 353 - 356.
- Portela, A. & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28 (10): 1057 - 1068.
- Poux, C., Madsen, O., Marquard, E., Vieites, D. R., de Jong, W. W. & Vences, M. (2005). Asynchronous colonization of Madagascar by the four endemic clades of primates, tenrecs, carnivores, and rodents as inferred from nuclear genes. *Systematic Biology*, 54 (5): 719 - 730.
- Ramos-Vara, J. A. & Miller, M. A. (2011). Immunohistochemical expression of E-cadherin does not distinguish canine cutaneous histiocytoma from other canine round cell tumors. *Veterinary Pathology*, 48 (3): 758 - 763.
- Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A. S., Bickle, T. A., Bitinaite, J. Blumenthal, R. M., Degtyarev, S. Kh., Dryden, D. T. F., Dybvig, K., Firman, K., Gromova, E. S., Gumport, R. I., Halford, S. E., Hattman, S., Heitmanm, J., Hornby, D. P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., ... & Xu, S - y (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research*, 31 (7): 1805 - 1812.
- Ryser, M. D., Mallo, D., Hall, A., Hardman, T., King, L. M., Tatishchev, S., Sorribes, I. C., Maley, C. C., Marks, J. R., Hwang, E. S. & Shibata, D. (2020). Minimal barriers to invasion during human colorectal tumor growth. *Nature Communications*, 11: 1280.
- Sanchez-Servin, A., Martinez, S., Cordova-Alarcon, E. & Fajardo, R. (2009). TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. *Journal of Veterinary Science*, 10 (4): 353 - 355.
- Sasaki, M., Kaneuchi, M., Sakuragi, N., Fujimoto, S., Carroll, P. R. & Dahiya, R. (2003). The polyglycine and polyglutamine repeats in the androgen receptor gene in japanese and caucasian popolations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312 (4): 1244 - 1247.
- Schmidt, G. H. & Mead, R. (1990). Problemes and paradigms: On the clonal origin of tumours - lessons from studies of intestinal epithelium. *BioEssays*, 12 (1) 37 - 40.
- Schwens, C., Thom, N. & Moritz, A. (2011). Reaktive und neoplastische histiozytäre Erkrankungen beim Hund. *Tierärztliche Praxis*, 39 (03): 176 - 190.

- Scott, D. W., Miller, W. H. & Griffin, C. E. (2001). Neoplastic and non-neoplastic tumors. In: Scott, D.,W., Mullter, G. H. & Miller, W. H. (Hrsg.). *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*. 6. Auflage. St Louis: WB Saunders. 1236 – 1414.
- Shibuya, H., Nonneman, D. J., Huang, T. H., Ganjam, V. K., Mann, F. A. & Johnson, G. S. (1993). Two polymorphic microsatellites in a coding segment of the canine androgen receptor gene. *Animal Genetics*, 24 (5): 345 - 348.
- Siegel, B. S., He, X., Hoadley, K. A., Hoyle, A., Pearce, J. B., Garrett, A. L., Kumar, S., Moylan, V. J., Brady, C. M., Van Swearingen, A. E. D., Marron, D., Gupta, G. P., Thorne, L. B., Kieran, N., Livasy, C., Mardis, E. R., Parker, J. S., Mengjje, C., Anders, C. K., Carey, L. A. & Perou, C. M. (2018). Integrated RNA and DNA sequencing reveals early drivers of metastatic breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 128 (4): 1371 - 1383.
- Soto, A. M. & Sonnenschein, C. (2011). The tissue organisation field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory. *BioEssays*, 33: 332 - 340.
- Spies, N. (2006). *Immunohistochemische Untersuchungen des kaninen kutanen Histiozytoms zur näheren Charakterisierung des Regressions- und Proliferationsverhaltens dieses Tumors* (Dissertation). Berlin: Freie Universität Berlin, Veterinär-Pathologie.
- Srinivasan, M., Sedmak, D. & Jewell, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *The American Journal of Pathology*, 161 (6): 1961 - 1971.
- Stanford, J. L., Just, J. J., Gibbs, M., Wicklund, K. G., Neal, C. L., Blumenstein, B. A. & Ostrander, E. A. (1997). Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: Molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Research*, 57 (6): 1194 – 1198.
- Stingele, J., Schwarz, M., Bloemeke, N., Wolf, P. & Jentsch, S. (2014). A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell*, 158 (2): 327 - 338.
- Stricker, T. P. & Kumar, V. (2010). Neoplasia. In: Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. & Aster, J. C.. *Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease*. 8. Auflage. Philadelphia: Saunders Elseviers. 259ff.
- Sudo, H., Li-Sucholeiki, X. - C., Marcelino, A. N., Gruhl, A. N., Zarbl, H., Willey, J. C. & Thilly, W. G. (2006). Distributions of five common point mutants in the human tracheal-bronchial epithelium. *Mutation Research*, 596: 113 - 127.
- Swierczek, S. I., Agarwal, N., Nussenzweig, R. H., Rothstein, G., Wilson, A., Artz, A. & Prchal, J. T. (2008). Hematopoiesis is not clonal in healthy elderly women. *Blood*, 112 (8): 3186 - 3193.
- Swierczek SI, Piterkova L, Jelinek J, Agarwal N, Hammoud S, Wilson A, et al. (2012). Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. *Blood*, 119 (13): 100 – 109.

- Taylor, D. O. N., Dorn, C. R. & Luis, O. H. (1969). Morphologic and biologic characteristics of the canine cutaneous histiocytoma. *Cancer Research*, 29: 83 – 92.
- Thirlwell, C., Will, O. C. C., Domingo, E., Graham, T. S. A., McDonald, S. A. C., Oukrif, D., Jeffrey, R., Gorman, M., Rodriguez-Justo, M., Chin-Aleong, J., Clark, S. K., Novelli, M. R., Jankowski, J. A., Wright, N. A., Tomlinson, I. P. M. & Leedham, S. J. (2010). Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology*, 138 (4): 1441 – 1454.
- Thompson, M. J., van Holdt, B., Horvath, S. & Pellegrini, M. (2017). An epigenetic aging clock for dogs and wolves. *Aging (Albany NY)*, 9 (3): 1055 - 1068.
- Tizard, I. R. (2004). Dendritic cells and antigen processing. In: Tizard, I. R. (Hrsg.). *Veterinary Immunology*. 7. Auflage. St. Louis, Missouri: Elsevier: 56 – 66.
- Tomita, A., Mochizuki, H., Tsuboi, M., Ogura, I., Igarashi, H., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Ohmi, A., Tomiyasu, H., Ohno, K., Nakagawa, T., Uchida, K., Nishimura, R. & Tsujimoto, H. (2019). Development of canine X-chromosome inactivation pattern analysis for the detection of cell clonality by incorporating the examination of the SLIT and NTRK-like family member 4 (SLITRK4) gene. *Research in Veterinary Science*, 125: 170 - 175.
- Uchida, T., Ohashi, H., Aoki, E., Nakahara, Y., Hotta, T., Murate, T., Saito, H & Kinoshita, T. (2000). Clonality analysis by methylation-specific PCR for human androgen-receptor gene (HUMARA-MSP). *Leukemia*, 14 (1): 207 – 212.
- van Niekerk, G., Davids, L. M., Hattingh, S. M. & Engelbrecht, A. M. (2017). Cancer stem cells: A product of clonal evolution? *International Journal of Cancer*, 140: 993 – 999.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R. & Feinberg, A. P. (1985). Use of restriction fragment length polymorphism to determine the clonal origin of human tumors. *Science*, 227: 642 - 645.
- Vernau, W. & Moore, P. F. (1999). An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69: 145 – 164.
- Wagener, C. & Müller, O. (2010). *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3., komplett aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 11.
- Wagner, L. A., Kiem, H. P., McSweeney, P., Schuening, F. G., Storb, R. & Ostrander, E. A. (1995). Development of a clonality assay for canine hematopoietic stem cells. *Blood*, 86 (8): 3265 -3267.
- Wainscoat, J. S. & Fey, M. F. (1990). Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Research*, 50 (5): 1355 - 1360.

- Wang, Y., Waters, J., Leung, M. L., Unruh, A., Roh, W., Shi, X., Chen, K., Scheet, P., Vattathil, S., Liang, H., Multani, A, Zhang, H., Zhao, R., Michor, F., Meric-Bernstam, F. & Navin, N. E. (2014). Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature*, 512 (7513): 155 - 160.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123 (3191): 309 - 314.
- Weiss, A. T. A. (2007). *Untersuchungen zur Charakterisierung des feline T-Zell-Rezeptors gamma: Grundlage für die molekulare Diagnose feline Lymphome durch Analyse klonal rekombinierter Antigenrezeptorgene* (Dissertation). Gießen: Justus-Liebig-Universität, Institut für Veterinär-Pathologie.
- Weiss, A. T. A., Klopffleisch, R. & Gruber, A. D. (2010). Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12: 929 - 935.
- Weiss, A. T. A., Delcour, N. M., Meyer, A. & Klopffleisch, R. (2011 a). Efficient and cost-effective extraction of genomic DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Veterinary Pathology*, 48 (4): 834 -838.
- Weiss, A. T. A., Klopffleisch, R. & Gruber, A. D. (2011 b). T-cell receptor γ chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*, 144 (2 - 3): 123 - 134.
- Werner, J. A., Woo, J. C., Vernau, W., Graham, P. S., Grahn, R. A., Lyons, L. A. & Moore, P. F. (2005). Characterization of feline immunoglobulin heavy chain variable region genes for the molecular diagnosis of B-cell neoplasia. *Veterinary Pathology*, 42: 596 - 607.
- Wikipedia Autoren (Bearbeitungsstand: 2019, 25. Dezember). X-Inaktivierung. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Zuletzt abgerufen am 20. März 2020, von <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=X-Inaktivierung&oldid=195204979>
- Wikipedia Autoren (Bearbeitungsstand: 2020, 27. Februar). Restriktionsenzym. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Zuletzt abgerufen am 20. März 2020, von <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Restriktionsenzym&oldid=197225057>
- Wikipedia Autoren (Bearbeitungsstand: 2020, 22. März). DNA-Methylierung. In Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Zuletzt abgerufen am 27. März 2020, von <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=DNA-Methylierung&oldid=197983459>
- Wikipedia Autoren (Bearbeitungsstand: 2020, 20. März). Skewed X-inactivation. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Zuletzt abgerufen am 20. März 2020, von https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Skewed_X-inactivation&oldid=946457496
- Willman, C. L., Busque, L., Griffith, B. B., Favara, B. E., McClain, K. L., Duncan, M. H. & Gilliland, D. G. (1994). Langerhans cell histiocytosis (histiocytosis X) – a clonal proliferative disease. *New England Journal of Medicine*, 331: 154 - 160.

- Winton, D. J., Blount, M. A. & Ponder, B. A. (1989). Polyclonal origin of mouse skin papillomas. *British Journal of Cancer*, 60: 59 - 63.
- Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., Ochiai, K., Nagano, M., Tomioka, Y., Sasaki, N, Hashizume, K. & Iwanaga, T. (2008). Novel variations and loss of heterozygosity of BRCA2 identified in a dog with mammary tumors. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (10): 1323 - 1328.
- Zavodovskaya, R., Chien, M. B. & London, C. A. (2004). Use of kit internal tandem duplications to establish mast cell tumor clonality in 2 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18: 915 - 917.

8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Weiss, A. T. A., **Delcour, N. M.**, Meyer, A., Klopfleisch, R. (2011 a). Efficient and cost-effective extraction of genomic DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Veterinary Pathology*, 48 (4): 834 - 838.

Delcour, N. M., Klopfleisch, R., Gruber, A. D., Weiss, A. T. A. (2013). Canine cutaneous histiocytomas are clonal lesions as defined by X-linked clonality testing. *Journal of Comparative Pathology*, 149 (2 - 3): 192 - 198.

Wienker, I., Böhmer, A., **Farwick, N.**, Kollerer, M., Binder, S., Gruber, A. D. (2016). Intradural myelolipoma in the cervical spine of a female Husky. *Kleintierpraxis*, 61 (2): 76 - 82.

Farwick, N. M., Klopfleisch, R., Gruber, A. D., Weiss, A. T. A. (2017). Microsatellites within the feline androgenreceptor are suitable for X chromosome-linked clonality testing in archival material. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19 (4): 454 - 460.

9 DANKSAGUNG

Zum Abschluss möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., geschäftsführender Direktor des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, für das Überlassen des Themas, die immer freundliche Unterstützung und die Korrektur des Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Alexander T. A. Weiss, PhD, für die sehr gute und geduldige Einarbeitung in die Labortechniken, für zahlreiche praktische Tipps und für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für das Korrekturlesen des Manuskriptes bedanke ich mich herzlich.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Tierpathologie möchte ich für die herzliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit danken.

Außerdem gilt mein ganz besonderer Dank meinem Mann Dirk, meiner Tochter Lisa und meinem Sohn Paul für die liebevolle und vielseitige Unterstützung, die Geduld und das Verständnis während der Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern für ihre langjährige und selbstlose Unterstützung danken.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

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

Lüdinghausen, den 09.03.2021

Nadine Maria Farwick

