

**Bachelorarbeit**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Bachelor of Engineering (B.Eng.)

**Genetische Untersuchung zum Vorkommen von Mutationen des c-Kit Gens bei  
kaninen Mastzelltumoren**

Von: Tobias Irrgang  
Matrikelnummer: 631070  
geboren am 12.02.1988

Hochschulbetreuer: Prof. Dr. Michael Meyer

Forschungseinrichtung:  
Laboklin GmbH & Co. KG  
Labor für klinische Diagnostik

Abteilungen:  
Pathologie und Molekularbiologie

Betreuer:  
PD Dr. Heike Aupperle - Fachtierärztin für Pathologie  
Alexandra Kehl - Diplom Biologin

Bad Kissingen, den 26.08.2011

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	3
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	3
2.1. Mastzellen .....	3
2.2. Mastzelltumore beim Hund.....	3
2.3. Diagnose von Mastzelltumoren .....	4
2.3.1. Zytologische Untersuchungen von Mastzelltumoren .....	4
2.3.2. Histologische Graduierung und Prognose von Mastzelltumoren .....	4
2.4. Tyrosinkinase-Rezeptor CD117, c-Kit .....	6
2.4.1. Aufbau des Tyrosinkinase-Rezeptors.....	6
2.4.2. Aktivierungskaskade des c-Kit Rezeptors.....	7
2.5. Therapie von Mastzelltumoren .....	10
2.6. Verfahren zur Untersuchung des c-Kit Rezeptors und seiner Mutationen.....	10
2.6.1. Immunhistologie .....	10
2.6.2. Genetische Analysen .....	11
2.6.2.1. Formen der Mutationen in Mastzelltumoren .....	12
2.6.2.2. Genetische Analysenverfahren zum Nachweis der Mutationen .....	13
<b>3. Material und Methoden</b> .....	17
3.1. Auswahl des Tierguts .....	17
3.2. Histologische und immunhistologische Untersuchungen.....	17
3.3. Genetische Untersuchungen.....	17
3.3.1. Ermittlung der Referenzsequenzen für die Exons 8, 9 sowie 11/12 der c-Kit Rezeptor-DNS .....	18
3.3.2. Extraktion der DNS .....	19
3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
3.3.4. Auswertung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.....	20
3.3.5. Aufreinigung der positiven PCR-Produkte .....	21
3.3.6. Sequenzierung der PCR-Produkte .....	21
3.3.7. Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte.....	22
3.3.8. Auswertung des DNS-Sequenzen mittels Sequencer .....	22
3.4. Analyse der Untersuchungsergebnisse .....	23
3.4.1. Resultate des Genetic Analysers .....	23
3.4.2. Vergleich der Sequencerausdrucke und der ClustalW2 Ergebnisse .....	23
3.5. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse.....	23
<b>4. Ergebnisse</b> .....	24
4.1. Charakterisierung des Tiergutes .....	24
4.2. Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen.....	24
4.3. Ergebnisse der genetischen Untersuchungen .....	25
4.3.1. Auswertung der Gelelektrophorese .....	25
4.3.2. Ergebnisse der Sequenzierung im Exon 8.....	27
4.3.3. Ergebnisse der Sequenzierung im Exon 9.....	27
4.3.4. Ergebnisse der Sequenzierung im Exon 11/12.....	28
<b>5. Diskussion</b> .....	35
5.1. Alters-, Rassen- und Geschlechtsverteilung im Tiergut.....	35
5.2. Diskussion der genetischen Ergebnisse .....	35
5.3. Diskussion der verwendeten Methoden im Bezug auf die Probenauswertbarkeit.....	37
5.4. Schlussfolgerungen.....	42
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	44
<b>I. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	45
<b>II. Tabellenverzeichnis</b> .....	46
<b>III. Abbildungsverzeichnis</b> .....	46
<b>IV. Literaturverzeichnis</b> .....	47

## **1. Einleitung**

Mastzelltumore sind eine der häufigsten Neoplasien bei Hunden. Obwohl sie sehr oft auftreten, sind die Zusammenhänge zwischen der Histologie und der genetischen Grundlagen dieser Erkrankung bisher kaum oder nur unzusammenhängend erforscht. Diese Arbeit soll dazu dienen, einige dieser Lücken im Verständnis der Pathogenese von kaninen Mastzelltumoren zu schließen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Mastzellen**

Mastzellen sind runde Zellen mit einem ovalen bis runden Zellkern und zahlreichen Granula im Zytoplasma, die u.a. Histamin und Heparin enthalten (London & Seguin, 2003; Schauer & Werle, 1959; Werle & Amann, 1955). Diese Granula können mittels verschiedener Färbeverfahren dargestellt werden (London & Seguin, 2003). Mastzellen sind maßgeblich an Entzündungsreaktionen des Körpers beteiligt (Dobson & Scase, 2007; Misdorp, 2004).

Beim Hund finden sich Mastzellen v.a. in Haut und Leber (O'Keefe, 1990).

### **2.2. Mastzelltumore beim Hund**

Mastzellen können neoplastisch entarten und sich zu potentiell malignen Mastzelltumoren (MCT) entwickeln.

Da Mastzellen ein natürlicher Bestandteil des Bindegewebes sind, können Mastzelltumore nahezu überall im Körper auftreten.

Mastzelltumore sind bei verschiedenen Spezies beschrieben (Orkin, 1967). Sie kommen aber überwiegend bei Hund, Mensch, Katze und Pferd vor (Cole et al., 2007; Wenger & Caron, 1988; Orkin, 1967).

Am häufigsten treten Mastzelltumore des Hundes in kutanem und subkutanem Gewebe auf. Es wurden aber auch primär viszerale Tumore z.B. in Milz, Leber und Niere dokumentiert (O'Keefe, 1990; Patnaik et al., 1984).

Mastzelltumore stellen eine der häufigsten Neoplasien der Haut beim Hund dar. Ihre Prävalenz liegt bei 7-21% (Welle et al., 2008). Die häufigsten Lokalisationen von Mastzelltumoren sind Kopf, Thorax und der Genital- bzw. Inguinalbereich (Sfiligoi et al., 2005; Simoes et al., 1994). Der Anteil von solitären MCT beträgt ca. 80%. Multiple MCT treten in ca. 14% der Fälle auf (Hottendorf & Nielsen, 1967).

Für bestimmte Hunderassen besteht ein erhöhtes Risiko Mastzelltumore zu entwickeln: Boxer, Boston Terrier, englische Bulldoggen, Sennenhunde, Labradore und Golden Retriever, Dackel, Cocker Spaniel, Schnauzer, Shar Peis, sowie brachycephale Rassen (Kiupel et al., 2010; Marconato et al., 2008; London & Seguin, 2003).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 8 und 14 Jahren (Kiupel et al., 2011; London & Seguin, 2003; O'Keefe, 1990; Patnaik et al., 1984).

Eine Geschlechtsdisposition ist nicht erkennbar (Dobson & Scase, 2007; Patnaik et al., 1984).

### **2.3. Diagnose von Mastzelltumoren**

Das klinische Erscheinungsbild von Mastzelltumoren variiert sehr stark. So kommen sowohl knotige als auch flächig infiltrative Formen oder auch reizlose, weiche, subkutane Tumore vor, die kaum von Lipomen zu unterscheiden sind (London & Seguin, 2003).

Die Komplikationen eines Mastzelltumors werden primär durch eine erhöhte Freisetzung von Histamin ausgelöst (z.B. verzögerte Wundheilung, Darier-Zeichen, Gastroduodenale Ulzera) (Govier, 2003; O'Keefe, 1990; Kenyon et al., 1983; Howard et al., 1969).

#### **2.3.1. Zytologische Untersuchungen von Mastzelltumoren**

Die einfachste diagnostische Methode zur Identifikation eines Mastzelltumors ist die zytologische Untersuchung von Feinnadelaspiraten. Normale, gut differenzierte Mastzellen können zytologisch meist leicht erkannt werden (Simoes & Schoning, 1994; O'Keefe, 1990).

#### **2.3.2. Histologische Graduierung und Prognose von kaninen Mastzelltumoren**

Die histologische Graduierung von Mastzelltumoren wurde bislang mittels der Klassifizierung nach Patnaik et al. (1984) durchgeführt. Die Einteilung erfolgt hierbei, wie in Tabelle 1 dargestellt, in drei Grade und diese korrelieren mit den Überlebenszeiten, wie in Tabelle 2 gezeigt.

Tab. 1: Histologische Graduierungskriterien von kaninen Mastzelltumoren (Patnaik et al. 1984)

Grad I	Grad II	Grad III
- gute Differenzierung - kaum Veränderungen von Kern- und Zellmorphologie - zahlreiche intrazytoplasmatische Granula	- schlechtere Differenzierung - einzelne mehrkernige Zellen und vereinzelt Mitosen - undeutlichere zytoplasmatische Granulierung	- schlechte Differenzierung - massive Veränderungen der Zellen (Kernpolymorphismen, multiple Mitosen, starke Variationen der Zellmorphologie) - Granula nur noch mit Spezialfärbungen erkennbar

Tab. 2: Prognose von kaninen Mastzelltumoren in Abhängigkeit vom histologischen Grad (Patnaik et al. 1984)

	Grad I [n]	Grad II [n]	Grad III [n]	Anzahl [n]
Hunde mit Mastzelltumoren	30 (36%)	36 (43%)	17 (20%)	83 (100%)
Verstorbene Hunde, oder Hunde, die an Mastzelltumoren verstorben sind	2 (7%)	20 (56%)	16 (94%)	38 (46%)
Hunde, die mind. 1500 Tage überlebt haben	28 (83%)	16 (44%)	1 (6%)	45 (54%)

Ein neueres Differenzierungssystem wurde 2011 von Kiupel et al. vorgeschlagen. Hier wird nur noch zwischen gut und schlecht differenzierten bzw. zwischen *low-grade malignant* und *high-grade malignant* Tumoren unterschieden. Bei diesem Einteilungssystem ist ein Tumor solange als *low-grade malignant* einzustufen, bis eines der folgenden Kriterien zutrifft:

- in zehn HPF treten mindestens sieben Mitosen auf
- in zehn HPF treten mindestens drei mehrkernige Tumorzellen auf
- in zehn HPF treten mindestens drei Zellen mit bizarren Zellkernen auf
- in zehn HPF variieren mindestens 10% der Tumorzellen erheblich in ihrer Größe

Ein HPF entspricht dabei einem sog. *High Power Field*, also dem Gesichtsfeld unter Verwendung eines Objektivs mit 40facher Vergrößerung.

In dieser Neueinteilung wird die mediane Überlebenszeit wie folgt angegeben:

*low-grade-MCT's* Patienten überleben ca. zwei Jahre, während Tiere mit *high-grade-MCT's* lediglich weniger als vier Monate überleben (Kiupel et al. 2011).

## 2.4. Tyrosinkinaserzeptor CD117, c-Kit

### 2.4.1. Aufbau des Tyrosinkinaserzeptors

Der c-Kit Rezeptor wird auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter auf Mastzellen, Stammzellen des hämatopoetischen Systems, Melanozyten, Keimzellen und Astrozyten sowie den Cajal Cells des autonomen Nervensystems des Darmes (Akin & Metcalfe, 2004).

Der Tyrosinkinaserzeptor, CD117/c-Kit, wird durch das c-Kit Proto-Onkogen kodiert. Der Rezeptor hat ein Molekulargewicht von etwa 145 kDa (Natali et al., 1992; Yarden et al., 1987). Es handelt sich um einen Transmembranrezeptor vom Typ III. Der Rezeptor setzt sich aus den drei folgenden Teilen zusammen (Volna et al., 2004) (Abb. 1):

1. dem intrazellulären Teil mit einer Phosphotransferasedomäne, einer ATP Bindungsstelle und einer juxtamembranen Domäne
2. der transmembranösen Domäne
3. der extrazellulären, immunglobulinartigen Domäne, welche aus insgesamt fünf Schleifen besteht.

An der Interaktion mit dem Liganden scheinen jedoch nur die ersten drei Rezeptorschleifen beteiligt zu sein (Hornick & Fletcher, 2007; Webster et al., 2006 a).

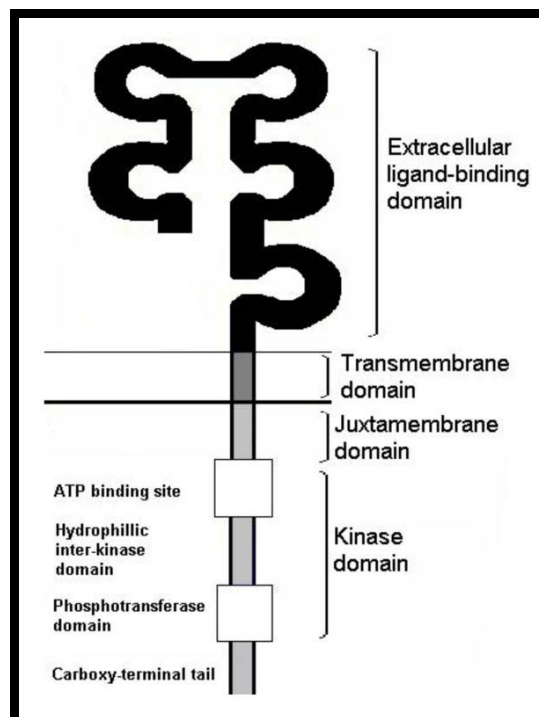


Abb. 1: Schematische Darstellung des Tyrosinkinaserzeptors (Webster et al. 2006a)

Der Tyrosinkinase-Rezeptor wird durch die Anlagerung des sog. Stammzellfaktors (SCF) an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors aktiviert. Der SCF wirkt speziell bei Mastzellen nicht nur als chemotaktischer Mediator, sondern auch als Wachstumsfaktor (Meininger et al., 1992). Er hat bei Mastzellen somit Einfluss auf die Zellreifung, die Proliferation und die Degranulation (Dastyk & Metcalfe, 1994; Yee et al., 1994; Columbo et al., 1992; Meininger et al., 1992; Tsai et al., 1991). In anderen Organen spielt der c-Kit Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese, der Spermatogenese und der Melanogenese (Matsuda et al., 1993).

#### 2.4.2. Aktivierungskaskade des c-Kit Rezeptors

Durch die Bindung des SCF an den extrazellulären Teil des Rezeptors, erfolgt eine Rezeptordimerisation, wodurch die Tyrosinkinase aktiviert wird (Abb. 2). Aus der Ligandenbindung resultiert die Autophosphorylierung des Rezeptors, sowie die Phosphorylierungen exogener Substanzen (Letard et al., 2008). Die phosphorylierten exogenen Substanzen führen im Folgenden zur Auslösung der Signalkaskade (Roskoski, 2005).

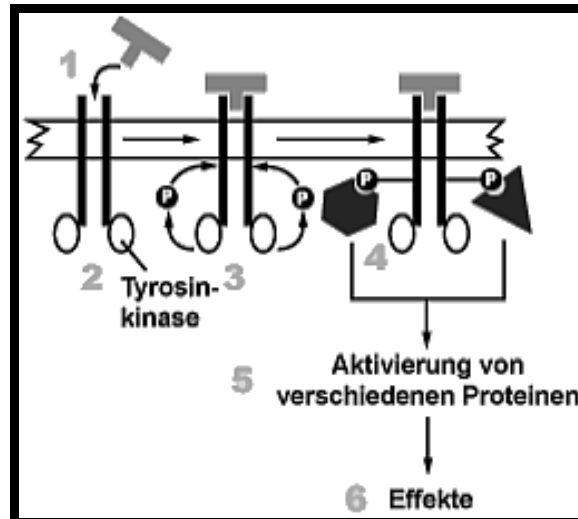


Abb. 2: Ablauf der Aktivierungskaskade des c-Kit Rezeptors (<http://www.megru.uzh.ch/j3/media/endo/tysinsy.gif>)

Legende: 1. Anlagerung des SCF, 2. Aktivierung der Tyrosinkinase, 3. Autophosphorylierung des Rezeptors durch die Tyrosinkinase, 4. Phosphorylierung verschiedener exogener Substanzen, 5. Auslösen der Signal-Kaskade, 6. Effekte für die Zelle (z.B. Angiogenese, Adhäsion, Proliferation, Apoptosessuppression, etc.)

Bei normalen Zellen steuert der Stammzellfaktor die Aktivität der Tyrosinkinase bzw. des Tyrosinkinaserzeptors. Treten jedoch Mutationen in der DNS des Rezeptorgens auf, so kommt es zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Rezeptors. Als Konsequenz kann eine ligandenunabhängige Autophosphorylierung des Rezeptors auftreten (Letard et al., 2008; London et al., 1999). Dementsprechend laufen dann auch alle sekundären Prozesse, wie z.B. die Zellproliferation, unkontrolliert ab.

Es wurde festgestellt, dass Mutationen bestimmter Membrandomänen des Tyrosinkinaserzeptors zur tumorösen Entartung von Mastzellen führen können, da die Veränderungen zur Autoaktivierung und somit zur Proliferation und Migration der Zellen führen (Crivellato et al., 2008; Letard et al., 2008; Webster et al., 2006 a; Tsai et al., 1991). Die hierfür verantwortlichen Mutationen scheinen beim Hund vor allem in der juxtamembranösen Domäne des Rezeptors lokalisiert zu sein (Webster et al., 2006 a; Zemke et al., 2002).

Insbesondere Tandemduplikationen, Deletionen, Substitutionen und Insertionen stehen im Verdacht eine neoplastische Entartung von Mastzellen hervorzurufen (Ohmori et al., 2008; Webster et al., 2006 a; Downing et al., 2002; Zemke et al., 2002).

Für Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP's) im c-Kit Gen konnte bisher keine biologische Relevanz nachgewiesen werden. Es handelt sich um sog. „stumme“ Mutationen (Letard et al., 2008; Ohmori et al., 2008; Zemke et al., 2002). Es gibt in den bisherigen Untersuchungen von Mastzelltumoren beim Hund (Tab. 4) nur einen dokumentierten SNP, der eine Veränderung der Aminosäureabfolge hervorruft, wobei hier vermutet wird, dass es sich um Fehler der publizierten c-Kit Sequenz handelt (Letard et al., 2008). Durch die aktivierenden Tandemmutationen ist besonders der durch das Exon 11 kodierte Rezeptorteil betroffen (Abb. 3).

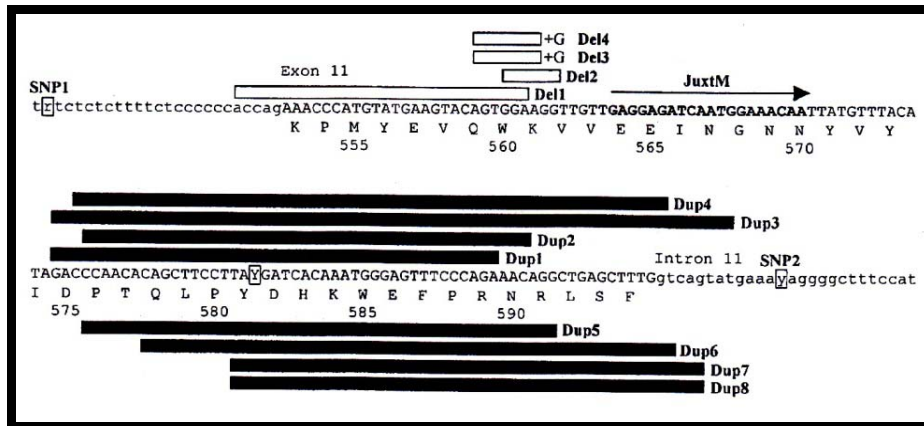


Abb. 3: Mutationen der DNS Sequenz der c-Kit juxtamembranen Domäne der Introns 10 und 11, sowie des Exons 11 im kaninen Tyrosinkinase-Rezeptor (Zemke et al., 2002)

Legende: A: Adenin, T: Thymin, G: Guanin, C: Cytosin, R: Adenin oder Guanin, Y: Cytosin oder Thymin, SNP: Single-Nukleotide-Polymorphism, Del: Deletion, Dup: Duplikation

Auch in den Genabschnitten für die extrazellulären Domänen des c-Kit Rezeptors treten Mutationen auf (Abb. 4), die ebenfalls eine ungesteuerte Autoaktivierung hervorrufen können. Hier sind die durch die Exons 8 und 9 exprimierten Rezeptorteile betroffen (Letard et al., 2008).

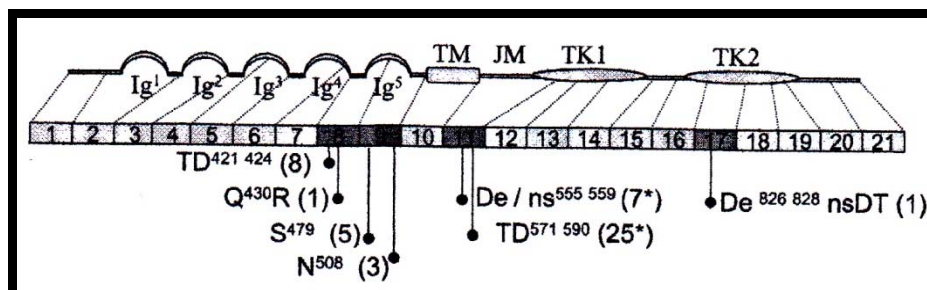


Abb. 4: Lokalisation und Häufigkeit von Mutationen des gesamten Tyrosinkinase-Rezeptors bei kaninen Mastzelltumoren (Letard et al. 2008)

Legende: Ig<sup>1-5</sup>: Immunoglobuläre Domäne (extrazellulärer Teil des Rezeptors), TM: Transmembranöse Domäne, JM: Juxtamembranöse Domäne, TK1: Tyrosinkinasedomäne Abschnitt 1 (ATP Bindungsstelle), TK2: Tyrosinkinasedomäne Abschnitt 2 (Phosphotransferasedomäne), TD<sup>xy</sup>: Tandem Duplikation von Nukleotidposition x bis y, De<sup>xy</sup>: Deletion von Nukleotidposition x bis y, ns<sup>xy</sup>: Insertion von Nukleotidposition x bis y, (x): Auftreten der Veränderung in x Fällen, Q<sup>430R</sup>: Aminosäuresubstitution von Glutamin zu Lysin an Aminosäureposition 430, S<sup>479</sup>: Auftreten von Serin an der Aminosäureposition 479, N<sup>508</sup>: Auftreten von Asparagin an der Aminosäureposition 508, DT: DT-Sequenz (nicht näher erläutert)

## **2.5. Therapie von Mastzelltumoren**

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Mastzelltumore zu therapieren. Neben einer klassischen Resektion des Tumors können auch Bestrahlungen, Chemotherapien, Steroide und Tyrosinkinase-Rezeptor-Antagonisten zum Einsatz kommen. Tyrosinkinaseinhibitoren blockieren dabei die Überfunktion mutierter Mastzellen (Camps-Palau et al., 2007; Govier, 2003). Der Einsatz dieser Mittel (z.B. Masivet<sup>®</sup>, Palladia<sup>®</sup>) erfordert nach Herstellerangaben den vorherigen Nachweis der c-Kit Mutation in dem kaninen Mastzelltumor.

## **2.6. Verfahren zur Untersuchung des c-Kit Rezeptors und seiner Mutationen**

Die Untersuchung kaniner Mastzelltumore auf mögliche Mutationen des c-Kit Rezeptors geht auf Studien an humanen MCTs zurück (London et al., 1999). Beim Menschen treten Veränderungen der c-Kit DNS vor allem in den Exons 9, 11, 13, 17 und 18 auf (Yanagihori et al., 2005; Lux et al., 2000).

Es kommen verschiedenste immunhistologische und genetische Untersuchungsmethoden zur Anwendung, um Mutationen der c-Kit DNS nachzuweisen (Trerè, 2000).

Zu kaninen Mastzelltumoren liegen sieben Studien zu c-Kit Mutationen vor (Letard et al., 2008; Ohmori et al., 2008; Webster et al., 2006 a; Webster et al., 2006 b; Downing et al., 2002; Zemke et al., 2002; London et al., 1999), die in einer Übersichtstabelle (Tab. 4) vergleichend dargestellt werden. Die Studien variieren hinsichtlich der Anzahl der untersuchten Tiere, der immunhistologischen Verfahren sowie bezüglich der verwendeten genetischen Analysemethoden, der untersuchten Genabschnitte und den identifizierten Mutationen.

### **2.6.1. Immunhistologie**

Mittels immunhistologischer Untersuchungen kann unter Verwendung spezifischer Antikörper das Expressionsmuster des c-Kit Rezeptors im histologischen Gewebeschnitt identifiziert werden. In Mastzelltumoren wurden drei verschiedene Expressionsmuster (Tab. 3) beobachtet, die von prognostischer Bedeutung sein sollen (Kiupel et al., 2004).

Tab. 3: Kriterien der c-Kit-Expressionsmuster und korrelierende Prognose für kanine Mastzelltumore nach Kiupel et al. (2004)

	<b>c-Kit - Muster 1</b>	<b>c-Kit - Muster 2</b>	<b>c-Kit - Muster 3</b>
Muster	- perimembranös mit nur geringer zytoplasmatischer Anfärbung	- fokal clusterartige, intensive, zytoplasmatische Anfärbung, teils stippchenartige Anfärbung	- diffuse zytoplasmatische Anfärbung mit Überlagerung anderer zellulärer Strukturen
Prognose	- Rezidivrate nicht erhöht - Keine Verkürzung der Lebenserwartung	- Rezidivrate erhöht - mögliche Verkürzung der Lebenserwartung	- Rezidivrate erhöht - wahrscheinliche Verkürzung der Lebenserwartung

Das c-Kit Muster 1 entspricht dem physiologischen Expressionsmuster (Webster et al., 2006 b; Kiupel et al., 2004).

Bislang ist ein Zusammenhang zwischen c-Kit Mutationen und atypischen immunhistologischen Expressionsmustern lediglich in einer Studie von Webster et al. (Webster et al., 2006 b) genannt worden: Es wird zwar ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Tandemduplikationen im Exon 11 und den atypischen immunhistologischen c-Kit Expressionsmustern 2 und 3 beschrieben, ohne dass dieses Phänomen erklärt wird.

### 2.6.2. Genetische Analysen

Zu Beginn der Darstellung genetischer Untersuchungsmöglichkeiten werden zuerst die Definitionen der Begriffe DNS, Intron, Exon und der Proteinbiosynthese erläutert (Stryer, 1995), um ein besseres Verständnis der im Folgenden angeführten möglichen Mutationsformen des c-Kit Rezeptors und der genetischen Analysenverfahren zu ermöglichen. Beide Übersichten ermöglichen ein besseres Verständnis der in Tabelle 4 gezeigten Vorgehensweisen verschiedener vorhergehender Studienarbeiten.

**1) DNS:** Die DNS ist ein langes Molekül in Form einer Doppelhelix, auf dem die genetischen Informationen gespeichert sind. Die DNS enthält vier Basen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin), deren Abfolge die Aminosäuresequenzen eines Organismus kodiert.

**2) Exons:** DNS Abschnitte, die aus der genomischen DNS in RNS transkribiert werden und letztendlich die Aminosäuresequenz eines Proteins bestimmen, werden Exons genannt. Exons sind expressionsrelevant und haben eine biologische Bedeutung.

**3) Introns:** DNS Abschnitte die keinen Einfluss auf die Expression von Aminosäuresequenzen haben, da sie vor der Translation aus der mRNA entfernt werden. Da Introns nicht expressionsrelevant sind, besitzen sie keinerlei biologische Bedeutung.

**4) Proteinbiosynthese:** Die Proteinbiosynthese dient der Erzeugung von Proteinstrukturen im Organismus. Hierzu wird die DNS zunächst in mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure) transkribiert. Die mRNA wird nach Prozessierung der hnRNA mittels tRNA (Transfer-Ribonukleinsäure) in den Ribosomen in eine Aminosäureabfolge translatiert. Aus den Aminosäuresequenzen entstehen schließlich, durch räumliche Prozessierung wie Faltung etc., Proteine.

#### **2.6.2.1. Formen der Mutationen in Mastzelltumoren**

**1) Deletionen** (Rossow et al., 2008; Stryer, 1995; Murken & Cleve, 1988): Unter Deletion versteht man den Verlust einer oder mehrerer Basenpaare, die eine Veränderung der produzierten Aminosäure zur Folge hat. Es sind Veränderungen des Leserasters möglich. Verluste einzelner Basenpaare treten eher selten auf.

**2) Insertionen** (Rossow et al., 2008; Stryer, 1995; Murken & Cleve, 1988): Als Insertion bezeichnet man den Einschub eines oder mehrerer Basenpaare innerhalb eines DNS-Abschnittes, welcher eine Veränderung der produzierten Aminosäure verursacht. Insertionen können Verschiebungen des Leserasters zur Folge haben.

**3) Tandemduplikationen** (Rossow et al., 2008; Braun et al., 2005; Murken & Cleve, 1988): Tandemduplikationen sind Abschnittsverdopplungen der DNS, wobei die duplizierten Abschnitte direkt hintereinander liegen. Die Verdopplungen verändern die Aminosäuresequenz und können eine Veränderung des Leserasters zur Folge haben.

**4) Substitutionen / Single-Nukleotide-Polymorphisms (SNP's)** (Rossow et al., 2008; Collins et al., 1998; Murken & Cleve, 1988): Einzelnukleotid-Polymorphismen, oftmals auch als Substitutionen bezeichnet, sind häufig vorkommende Basenaustausche. Hierdurch können verschiedene Allelvarianten eines Gens entstehen. Die Abweichungen der betroffenen Basen können dabei di- bis tetraallelisch sein, allerdings sind tri- und tetraallelische Formen sehr selten. Einzelnukleotid-Polymorphismen machen etwa 90% aller Mutationen im menschlichen Genom aus und stellen somit die häufigste Form genetischer Mutationen beim Menschen dar. SNP's können einen funktionellen Basenaustausch

verursachen, d.h. sie können eine Änderung der Aminosäureabfolge bewirken, die meisten SNP's sind jedoch klinisch nicht relevant bzw. stumm. Da es sich nur um Basen-Polymorphismen handelt, bleibt das Leseraster unberührt.

### 2.6.2.2. Genetische Analyseverfahren zum Nachweis der Mutationen

Die Mutationen bei Mastzelltumoren können mit verschiedenen Verfahren untersucht werden.

**1) PCR** (Rossow et al., 2008; Stryer, 1995): Die PCR, oder auch Polymerase-Kettenreaktion, dient der Amplifizierung spezifischer, definierter Genabschnitte der DNS *in vitro*. Der zu vervielfältigende Abschnitt wird mittels bekannter DNS-Primer eingegrenzt. Die Verwendung von *Forward* und *Reverse* Primern ermöglicht eine genaue Eingrenzung des zu amplifizierenden Genabschnitts.

Die Vorteile der PCR sind ihre hohe Spezifität und die Geschwindigkeit des Verfahrens.

**2) RT-PCR** (Rossow et al., 2008; Stryer, 1995): Die Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion dient dazu, mittels reverser Transkriptasen aus der RNS eines Gens cDNS zu synthetisieren, die dann mittels PCR analysiert werden kann. Reine RNS wäre einer Auswertung durch eine „normale“ PCR nicht zugänglich.

**3) Gelelektrophorese** (Rossow et al., 2008; Stryer, 1995): Die Gelelektrophorese dient der Trennung von Proteinen oder Makromolekülen, wie DNS (z.B. aus der PCR) oder RNS, aufgrund deren Nominalladung und Größe. Die Verwendung von Gelen bei der Elektrophorese optimiert die Auftrennung durch eine Unterdrückung von Konvektionsströmen und der Wirkung des Gels als molekulares Sieb. Als Ergebnis stellen sich Banden unterschiedlicher Wanderungslänge auf dem Gel ein, beginnend mit den schwersten (größten) Substanzen nahe dem Elutionspunkt bis hin zu den leichtesten (kleinsten) Stoffen weiter entfernt vom Elutionspunkt.

Die Auswertung des Elektrophoreseergebnisses erfolgt mittels Anfärbung durch Ethidiumbromid und unter UV-Licht.

Die Gelelektrophorese ermöglicht eine Aussage über das spezifische Gewicht und somit zur Art und Menge von PCR Reaktionsprodukten. So kann man den Erfolg der Polymerase-Kettenreaktion beurteilen.

Der Vorteil der Methode ist die Möglichkeit, Substanzen nach ihrer Größe zu trennen und damit Aussagen über die Inhaltsstoffe eines Gemisches treffen zu können.

Ein Nachteil der Gelelektrophorese ist die Giftigkeit der zur Anfärbung verwendeten Stoffe wie Ethidiumbromid.

**4) Klonierung** (Rossow et al., 2008; Stryer, 1995): Die Klonierung dient, wie die PCR, zur Amplifizierung bestimmter Genabschnitte. Der Ablauf einer Klonierung erfolgt *in situ* in Wirtszellen, während die PCR *in vitro* stattfindet. Bei der Klonierung wird die zu vermehrende genomische DNS mittels Restriktionsenzymen in größere Stücke unterteilt. Diese werden anschließend mittels Elektrophorese getrennt. Die getrennten Einzelteile werden in die DNS sog. Vektoren, wie z.B. Lambda-Phagen, integriert. Anschließend werden z.B. Wirtsbakterien wie E. coli mit diesen Vektoren infiziert. Die infizierten Bakterien produzieren nun das gewünschte Genprodukt in großen Mengen.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der kostengünstigen Vermehrung von DNS in großen Mengen. Nachteilig an dieser Methode ist aber, dass möglicherweise Mutationen innerhalb der E. coli Bakterien auftreten, die spätere Erbgutauswertung verfälschen können.

**5) Sequenzierung** (Rossow et al., 2008; Stryer, 1995): Die Sequenzierung dient der Auswertung und Darstellung der in der PCR erzeugten Reaktionsprodukte. Jede DNS-Base wird dabei mit ihrer komplementären Base kombiniert, wobei sich an den komplementären Gegenstücken zusätzlich jeweils unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe befinden. Anschließend werden mittels Gelelektrophorese und Fluoreszenzmessung die PCR Produkte getrennt und Basenabfolge anhand der Farbabfolge automatisch bestimmt. Die hohe Auflösung der Methode erlaubt es selbst Punktmutationen präzise nachzuweisen.

Vorteile dieses Verfahrens sind die automatische Auswertung von DNS-Sequenzen, sowie die hohe Auflösung und Effektivität. Nachteile sind z.B. die relativ hohen Kosten einer Analyse.

**6) Fluorescent activated Cell sorting (FACS)** (Stryer, 1995): Die Durchflusszytometrie dient der Analyse und Auftrennung verschiedener Zelltypen anhand ihrer spezifischen Eigenschaften (z.B. spezifischer Rezeptoren). Hierzu werden fluoreszierende Substanzen, wie z.B. fluoreszierende Antikörper, zu den Zellen gegeben, die sich spezifisch an bestimmte Zellen oder Zellmoleküle binden. Mittels einer Fluoreszenzmessung können Zellen mit den gesuchten Molekülen identifiziert und von den übrigen Zellen getrennt werden.

Ein Vorteil der Methode ist die Separation von Zellen anhand spezifischer Oberflächeneigenschaften. Nachteile des Verfahrens sind z.B. der hohe Aufwand und die benötigten spezifischen Antikörper.

**7) Western Blotting** (Stryer, 1995): Das Western Blotting dient der Detektion sehr kleiner Mengen bestimmter Proteine in einer Zelle oder in einem Substanzgemisch. Die Proben werden zuerst einer elektrophoretischen Trennung unterzogen. Die gesuchten Proteine werden dann mittels farbstoffmarkierter spezifischer Antikörper identifiziert.

Der Vorteil der Methode liegt in der Nachweisbarkeit selbst kleinster Mengen eines Proteins in einem Substanzgemisch. Auch hier sind, wie bei der FACS, die benötigten spezifischen Antikörper und die damit verbundenen Kosten möglicherweise von Nachteil.

Der Zweck der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen besteht darin, die bislang vorliegenden Forschungsergebnisse im Bereich der Mastzellneoplasien zu überprüfen und neue Erkenntnisse im Zusammenhang zwischen c-Kit Mutationen, Neoplasie-multiplizität, histologischem Tumorgrad und der Immunhistologie des c-Kit zu gewinnen.

Tab. 4: Übersicht über Methoden und Ergebnisse der Untersuchungen von Mutation des c-Kit Gens bei kaninen Mastzelltumoren

Autor/ Land	Untersuchungsmaterial (Anzahl)	Histologischer Grad (Anzahl)	c-Kit Immunhistologie	Untersuchte Rassen	Untersuchte Exons/Introns	Genetische Analysemethoden	Ergebnisse
- Downing et al. (2002) - USA	- Form., Para. (n=157) - Zellkultur (n=2)	- I (n=12) - II (n=119) - III (n=26)	- k. A.	- Boxer, Retriever, Shar Pei, Terrier, Sonstige	- Exons: 11, 12 - Intron: 11	- gDNS, PCR, GE, Klon., Seq., GE	- <b>Seq. / 2. GE*:</b> - <b>ITD's:</b> Grad I (n=1/12), Grad II (n=42/119), Grad III (n=9/26)
- Letard et al. (2008) - Frankreich, USA	- Native Tumorbiopsien (n=191)	- rezidivierend und/oder nicht entfernbar - II (k. A.) - III (k. A.)	- k. A.	- Boxer, Retriever, Labrador, Rho- desian Ridge- back, Weimara- ner, Sonstige	- Exons: 8, 9, 11, 17	- RNS, RT-PCR, PCR, Seq., FACS, WB - doppelte Untersu- chung bei pos. Muta- tionen	- <b>Seq.:</b> - <b>ITD's:</b> Exon 8 (n=8), Exon 11 (n=25) - <b>Dele-/Substitu/ Insertionen:</b> Exon 8 (n=1), Exon 9 (n=8), Exon 11 (n=14), Exon 17 (n=1) - <b>SNP's:</b> Exon 8-17 (n=6)
- London et al. (1999) - USA	- Form., Para. (n=11) - Zellkultur (n=2)	- II (n=11)	- k. A.	- k. A.	- Exons: 11, 12 - Introns: 11	- gDNS, RNS, PCR, RT-PCR, Klon., GE, Seq., GE, FACS, WB	- <b>Seq. / 2. GE:</b> - <b>ITD's:</b> Exon 11/12 (n=5/11), Zellkulturen (n=1/2)
- Ohmori et al. (2008) - Japan	- Zellkultur (n=1)	- II (n=1)	- k. A.	- Retriever	- Exons: 4, 5, 9, 10, 11, 12 - Introns: 4, 9, 11	- gDNS, RNS, RT-PCR, Klon., Seq., FACS	- <b>Seq.:</b> - <b>Deletionen/Isoformen:</b> Exon 4/5 (n=2), Exon 9/10 (n=1) - <b>SNP's:</b> Intron11 (n=3)
- Webster et al. (2006 a) - USA	- Form., Para. (n=33) - LCM	- k. A.	- k. A.	- k. A.	- Exons: 16, 17, 18, 19, 20	- gDNS, PCR, Seq., GE	- <b>Seq. / 2. GE:</b> - keine Mutationen gefunden
- Webster et al. (2006 b) - USA	- Form., Para. (n=60) - LCM	- I (n=8) - II (n=45) - III (n=7)	- Muster 1 (n=25) - Muster 2 (n=24) - Muster 3 (n=11)	- Basset, Boxer, Mischlinge, Mops, Retriever, Spaniel, Sonstige	- Exon: 11 - Intron: 11	- gDNS, PCR, Seq.	- <b>Sequenzierung:</b> - <b>ITD's:</b> Grad II (n=4/45), Grad III (n=5/7)
- Zemke et al. (2002) - USA	- Form., Para. (n=88)	- I (n=24) - II (n=58) - III (n=6)	- k. A.	- Boxer, Mischlinge, Pit Bull, Retriever, Terrier	- Exon: 11 - Introns: 10, 11	- gDNS, PCR, GE, Seq., GE	- <b>Seq. / 2. GE:</b> - <b>ITD's:</b> Grad II (n=4/58), Grad III (n=4/6) - <b>Deletionen:</b> Grad II (n=4/58) - <b>SNP's:</b> Intron 10 (n=1), Intron 11 (n=4), Exon 11 (n=1)

Form.: Formalin, Para.: Paraffin, Klon.: Klonierung, LCM: Laser Capture Microdissection, gDNS: genomische DNS, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, GE: Gelelektrophorese, Seq.: Sequenzierung, RT-PCR: Reverse Transkriptase PCR, FACS: Durchflusszytometrie, WB: Western Blot, ITD: Internal-Tandem-Duplikation, SNP: Einzelnukleotidpolymorphismus, k. A.: Keine Angabe  
\*: Die separate 2. Gelelektrophorese ist als letztendlicher Auswertungsschritt für einige Sequenzierverfahren notwendig und wird deshalb zusätzlich zur ersten GE aufgeführt

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Auswahl des Tierguts**

Für die Untersuchungen wurden formalinfixierte Gewebeproben aus dem Routineeinsendungsmaterial von Laboklin GmbH & Co. KG verwendet. In die eigenen Untersuchungen wurden die kaninen Mastzelltumoren aus den Monaten April bis Oktober des Jahres 2010 einbezogen, von denen vorberichtliche Angaben zu Rasse, Alter, Geschlecht des Hundes und der Lokalisation des Tumors möglichst vollständig vorhanden waren.

Die durch die Studienleitung vorausgewählten Fälle, wurden tabellarisch erfasst und die fehlenden Daten aus der Datenbank ergänzt. Hierzu gehörten u.a. Geschlecht, Alter und Rasse der Hunde sowie die Lokalisation und Größe der Neoplasie.

#### **3.2. Histologische und immunhistologische Untersuchungen**

Alle Proben wurden im Rahmen der Routine makroskopisch dokumentiert, zugeschnitten und repräsentative Proben für die Histologie eingebettet. Die Objektträger wurden mittels Hämatoxylin-Eosin und Giemsa gefärbt (Simoes & Schoning, 1994).

Alle MCT wurden mittels immunhistologischer Standardverfahren auf das Expressionsmuster des c-Kit Rezeptors untersucht.

Die Auswertung der Histologie und Immunhistologie erfolgte durch die Pathologen der Abteilung entsprechend der Definitionen von Patnaik et al. (1984) und Kiupel et al. (2004).

#### **3.3. Genetische Untersuchungen**

Alle genetischen Untersuchungen wurden in der molekularbiologischen Abteilung der Laboklin GmbH & Co. KG durchgeführt. Proben von Tieren mit multiplen Mastzelltumoren wurden zu jeweils einer Probe gepoolt. Es wurden folgende Analysenverfahren angewendet:

1) PCR aus genomischer DNS, 2) Gelelektrophorese, 3) Sequenzierung

Diese Methoden entsprechen den bislang in der Literatur angewendeten Vorgehensweisen.

### 3.3.1. Ermittlung der Referenzsequenzen für die Exons 8, 9 sowie 11/12 der c-Kit Rezeptor-DNS

Um im Verlauf der DNS-Analysen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die für die Untersuchungen relevanten Exonabschnitte aus der extrahierten DNS amplifizieren zu können, wurden exonspezifische Primer benötigt. Deshalb wurden zunächst die Referenzsequenzen ermittelt, die später als Vorlage zur Herstellung für die benötigten Primer dienten.

Die Referenzsequenzen der Exons 8 und 9 wurden mittels Abgleich von Literaturvorlagen (Letard et al., 2008; London et al., 1999) und der c-Kit coding Sequenz (CDS) der NCBI Datenbank als Referenz für die Untersuchungen verwendet. Die gesamte c-Kit coding Sequenz kann in der Proteindatenbank des NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) unter folgender Nummer abgerufen werden: NM\_001003181.1

Großbuchstaben stehen bei den Sequenzen für Exonnuklide, Kleinbuchstaben für Intronnuklide:

#### Referenzsequenz Exon 8:

```
5'- CAAAACCAGAAATCCTGACTCATGAAAGTCTCACAAATGGCATGCTCCAGTG  
TGTGGTTGCAGGATTCCCAGAGCCCGCAGTAGATTGGTATTTCTGTCCAGGAGC  
TGAGCAGAG-3'
```

#### Referenzsequenz Exon 9:

```
5'-ATGTTCTGTCCCTATTGGGCCAATGGATGTGCAGATGCAAACCTCGTCTCTG  
TCACCGTCTGGAAACTAGTGGTTCAGAGTTCATCGATTATAGTGCCTTCAAG  
CACAATGGCACAGTCGAGTGTAGGGCTTACAACAATGTAGGCAGGAGTTCTGC  
CTTTTTTAACTTTGCATTTAAAG-3'
```

Da neben Mutationen im Exon 11/12 nach Zemke et al. (2002) ebenfalls Einzel-Nukleotid-Polymorphismen im Intron 11 wahrscheinlich sind, wurde dieses Intron mit in die verwendete Referenzsequenz integriert. Da Intronabschnitte nicht in der CDS aufgeführt werden, wurden hier für den Abgleich der Literaturvorlagen (Letard et al., 2008; Zemke et al., 2008; Downing et al., 2002) mit bekannten Sequenzen Daten, aus der UCSC-Datenbank verwendet. Dazu wurden die CDS-Abschnitte der Exons 11 und 12 aus der NCBI Sequenz in der Blat Search für Hunde (Unterkategorie „Dog“) der UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/cgi->

bin/hgBlat?command=start) gesucht. Im Ergebnis sind alle an die eingegebenen Exons angrenzenden Intronabschnitte enthalten.

### Referenzsequenz Exon 11/12:

```
5'-AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGAAGGTTGTTGAGGAGATCAATGGAAAC
AATTATGTTTACATAGACCCAACACAGCTTCCTTACGATCACAAATGGGAGTTTC
CCAGAAACAGGCTGAGCTTTGgtcagtatgaaataggggcttccatgtaacctttgtgtacgtgaaca
atgactttaggaacccattagcttccttgttctgttccaactgagacaataagtatttctgtgaagttcatctttgatg
attcctcataaagcaccttatagagaaatgtccttagctggattgtcctaattccttaacaattccttgattgtgacttga
attaccagatgctccttggcctatcaccacccttactctttctccttctgcagGGAAAACTTTGGGGCTG
GTGCCTTCGGGAAAGTGGTTGAAGCCACTGCATATGGCCTGATTAAGTCGGATG
CGGCCATGACTGTTGCCGTTAAGATGCTCAAAC-3'
```

### 3.3.2. Extraktion der DNS

Die zur Untersuchung benötigte DNS wurde zunächst aus den paraffineingebetteten Proben extrahiert. Zur Extraktion wurde ein blackPREP FFPE DNS Kit der Firma Analytik Jena (Bestellnummer: B45-BP-0020050) verwendet. Alle verwendeten Reagenzien wurden dem Testkit entnommen. Das Probenmaterial wurde nach folgendem Ablaufschema bearbeitet:

1. Paraffinschnitte in ein Reaktionsgefäß füllen
2. 400µl Lysepuffer QPT und 25µl Proteinase K zugeben
3. 5 Sekunden durchmischen
4. 60 Minuten bei 50°C inkubieren
5. unter Schütteln bei 90°C für weitere 60 Minuten inkubieren
6. 1 Minute lang mit 13000 RPM zentrifugieren
7. Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
8. 200µl Bindungspuffer SBS zum Überstand geben und durchmischen
9. Probe auf Filtereinsatz geben
10. 2 Minuten bei 13000 RPM in ein 2ml Auffangröhrchen zentrifugieren
11. gebrauchtes Auffanggefäß verwerfen und ersetzen
12. 700µl Waschpuffer MS auf Filtereinsatz geben
13. 1 Minute bei 13000 RPM zentrifugieren
14. Filtrat verwerfen und Auffangröhrchen wiederverwenden
15. Schritt 7 wiederholen
16. 2 Minuten bei 13000 RPM trocken zentrifugieren
17. Auffangröhrchen verwerfen
18. Filter in ein 1,5ml Elutionsgefäß platzieren
19. 100µl Elutionspuffer zugeben
20. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
21. 1 Minute bei 8000 RPM zentrifugieren
22. Extrahierte DNS bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C lagern

### 3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Vor Beginn der PCR wurden 5 µl der extrahierten DNS mit je 0,5 µl Q-Taq der Firma Qiagen (Bestellnummer: 201203) und je 44,5 µl des selbst hergestellten Mastermixes des jeweiligen Exons versetzt.

Die verwendeten DNS-Primer wurden durch die Firma Eurofins MWG Biotech hergestellt. Die verwendeten Primersequenzen lauten:

- Exon 8 Forward: 5'-GGTGAGGTGTTCCAGCAGTC-3'  
Exon 8 Reverse: 5'-CCTTCCCTCGTGCACATTA-3'  
Exon 9 Forward: 5'-TTTCCTAGAGTAAATCCAGGCTGT-3'  
Exon 9 Reverse: 5'-GCAGGCAGAGCCTAAACATC-3'  
Exon 11/12 Forward: 5'-TACCCAGATGCTCCTTTGGT-3'  
Exon 11/12 Reverse: 5'-AAGAAGCAAATTTGGCAAGC-3'

Die Mastermixe wurden wie folgt angesetzt:

1. 28,5µl HPLC-Wasser
2. 5µl PCR-Puffer
3. 4µl (25mM) MgCl<sub>2</sub>
4. 5µl (2mM) dNTPs
5. 1µl (10µM) Forward Primer des jeweiligen Exons (8, 9, 11/12)
6. 1µl (10µM) Reverse Primer des jeweiligen Exons (8, 9, 11/12)

Anschließend wurde die Polymerase-Kettenreaktion auf einem Thermocycler der Firma Eppendorf durchgeführt. Der Programmablauf gliedert sich wie folgt:

1. 95°C 10 Minuten
2. 95°C 30 Sekunden
3. 60°C 30 Sekunden
4. 72°C 60 Sekunden
5. 2. bis 4. 35x wiederholen
6. 72°C 10 Minuten

### 3.3.4. Auswertung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels 4% Agarose E-Gel Platten der Firma Invitrogen (Bestellnummer: G8008-04) und dem dazugehörigen DNS-Marker "E-Gel Low Range - Quantitative DNA Ladder" der Firma Invitrogen (Bestellnummer: 12373-031) ausgewertet. Die Elektrophorese wurde wie folgt durchgeführt:

1. Markervertiefungen mit je 10µl Aqua dest. und 10µl Marker befüllen
2. Probenvertiefungen mit je 12µl Aqua dest. und 8µl des PCR-Produktes befüllen
3. nicht verwendete Vertiefungen mit je 20µl Aqua dest. befüllen
4. Gel anschließend 20min an 230V anlegen
5. Gelplatte nach Schritt 4 auf einem UV-Schirm auslesen

Für das Exon 8 lag die gesuchte Länge bei 200 Basenpaaren (BP), für das Exon 9 bei 300 BP und für das Exon11/12 bei 400 BP. Die Ermittlung der Länge des untersuchten DNS-Stückes erfolgte durch einen Bandenabgleich der Untersuchungsbande mit dem DNS Marker (DNS Stücke bekannter Länge).

Bei allen negativen Ergebnissen wurde die PCR mit einer 1:10 Verdünnung der extrahierten DNS wiederholt, um auf diese Weise evtl. vorhandene Reste von Inhibitoren in der DNS (z.B. Formalinreste) soweit zu verdünnen, dass eine Auswertung der DNS möglich wird.

Alle PCR-Produkte, bei denen die Auswertung des Elektrophoresegels ein positives Ergebnis erbrachte, wurden in den im Folgenden erläuterten Schritten aufgereinigt, sequenziert, erneut aufgereinigt und schließlich mittels Sequencer ausgewertet.

### **3.3.5. Aufreinigung der positiven PCR-Produkte**

Zur Durchführung der ersten Aufreinigung wurde das MinElute PCR Purification Kit von Qiagen (Bestellnummer: 28006) verwendet. Alle verwendeten Reagenzien wurden dem Testkit entnommen.

1. 250µl PBI-Puffer und 50µl PCR-Produkt vortexen
2. Ansatz auf die Säule geben
3. bei 13000 RPM für 1 Minute zentrifugieren
4. Auffanggefäß werfen
5. neues Gefäß verwenden
6. 600µl PE-Puffer zugeben
7. bei 13000 RPM für 1 Minute zentrifugieren
8. Auffanggefäß werfen
9. neues Gefäß verwenden
10. 1 Minute bei 13000 RPM trocken zentrifugieren
11. Auffanggefäß werfen
12. beschriftetes Eppendorf-Reaktionsgefäß unter die Säule stellen
13. 30µl EB-Puffer zugeben
14. 1 Minute bei RT inkubieren
15. 1 Minute bei 8000 RPM zentrifugieren
16. Säule werfen
17. Eluat bis zum weiteren Gebrauch kühl lagern

### **3.3.6. Sequenzierung der PCR-Produkte**

Nach dem ersten Aufreinigungsschritt wurden die PCR-Produkte mittels Sequenzierung analysiert. Der Terminator Mix (T.Mix) wurde dem BigDye Terminator v 1.1. Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems (Bestellnummer: 4336776) entnommen.

Der Sequenzierungsansatz wurde wie folgt hergestellt:

1. 4µl T.Mix
2. 3µl Aqua dest.
3. 1µl Primer (2µM) je nach sequenziertem Exon (Juxt 8F, Juxt 8R; Juxt 9F, Juxt 9R; Juxt11F, Juxt11R)
4. 2µl aufgereinigtes PCR-Produkt zugeben
5. Sequenzierungsreaktion auf einem Thermocycler durchführen

Temperaturprofil:

- |    |           |                 |
|----|-----------|-----------------|
| 1. | 96°C      | 1 Minute        |
| 2. | 96°C      | 10 Sekunden     |
| 3. | 60°C      | 5 Sekunden      |
| 4. | 60°C      | 4 Sekunden      |
| 5. | 1. bis 4. | 26x wiederholen |
| 6. | 4°C       | bis Ende        |

### **3.3.7. Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte**

Nach Abschluss der Sequenzierungsreaktion wurden die Reaktionsprodukte erneut gereinigt. Zur zweiten Aufreinigung wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit von Qiagen (Bestellnummer: 63206) verwendet. Alle verwendeten Reagenzien wurden dem Testkit entnommen. Die Anleitung schreibt folgendes Vorgehen vor:

1. 10µl Aqua dest. zur Sequenzierreaktion geben und vortexen
2. DyeEx Säule gut vortexen
3. unteren Plastikverschluss abdrehen
4. Säule in ein Auffanggefäß einsetzen
5. 5 Minuten bei 2800 RPM zentrifugieren
6. Auffanggefäß verwerfen
7. Säule in ein neues Gefäß einsetzen
8. 20µl des Ansatzes (siehe Schritt 1) mittig auf die Säule pipettieren
9. Säule bei 2800 RPM für 5 Minuten abzentrifugieren

### **3.3.8. Auswertung der DNS-Sequenzen mittels Sequencer**

Die Auswertung der DNS-Sequenzen erfolgte mittels eines „Genetic Analyser 3130“ von Applied Biosystems. Vor der Analyse wurden 6µl der aufgereinigten Sequenzierungsreaktion mit 7µl HIDI-Formamid vermischt und in die entsprechende Vertiefung der Analyserplatte gegeben. Die Auswertung wurde von dem Gerät automatisch vorgenommen.

### **3.4. Analyse der Untersuchungsergebnisse**

#### **3.4.1. Resultate des Genetic Analysers**

Die Analyse der erhaltenen Gensequenzen erfolgte in zwei Schritten:

1. Die vom Sequencer „Genetic Analyser 3130“ der Firma Applied Biosystems erstellten DNS Analysenresultate wurden gespeichert und ausgedruckt. Die Ergebnisausdrucke wurden hinsichtlich ihrer Qualität und Auswertbarkeit überprüft und bei Mängeln einer wiederholten Auswertung bzw. Untersuchung unterzogen. Als Mängel traten z.B. zu kurze DNS-Sequenzen, oder zu starke Überlagerungen der Messergebnisse mit Störsignalen auf.
2. Die vom Sequencer ermittelten DNS-Sequenzen wurden im Anschluss mittels des Online-Computerprogramms „ClustalW2“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) mit der für jedes Exon spezifischen Referenzsequenz abgeglichen. Das Programm stellte dabei vorhandene Übereinstimmungen und Abweichungen in der DNS automatisch fest.

#### **3.4.2. Vergleich der Sequencerausdrucke und der ClustalW2 Ergebnisse**

Die Sequencerausdrucke wurden in Kombination mit den ClustalW2 Vergleichsresultaten manuell-visuell ausgewertet. Evtl. aufgetretene Mutationen wurden entsprechend markiert und tabellarisch erfasst.

Zur Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse bzw. Sequencerausdrucke und der exonzugehörigen Bezugssequenz wurden die unter Punkt 3.3.1. bereits genannten Referenzsequenzen der Exons 8, 9, 11/12 verwendet.

### **3.5. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse**

Die statistische Auswertung erfolgte durch einen externen Statistiker mittels des Statistikprogramms SPSS 18 mit Kreuztabellen und dem Exakten Fisher-Test bei einseitiger bzw. zweiseitiger Fragestellung (Hünsler & Zimmermann, 2010).

#### 4. Ergebnisse

Insgesamt wurden 86 Proben untersucht. Bei 12 Proben zeigte die gelelektrophoretische Auswertung der PCR in keinem Durchlauf bei keinem Exon ein positives Ergebnis, weshalb die weiterführenden Analysen für diese Fälle verworfen wurden. In den folgenden Abschnitten werden nur die 74 Proben ausgewertet, bei denen mindestens ein PCR-Durchgang in einem Exon ein positives Ergebnis erbrachte.

##### 4.1. Charakterisierung des Tiergutes

Von den 74 abschließend untersuchten Hunde waren 18 männlich, neun männlich kastriert, 20 weiblich und 20 weiblich kastriert. Bei sieben Tieren war das Geschlecht unbekannt. Das Alter der untersuchten Hunde war bei 63 Individuen bekannt und bei elf unbekannt. Der Mittelwert lag bei neun Jahren mit einer Standardabweichung von 2,7 Jahren. Die Rasse war bei 67 Hunden bekannt und bei sieben unbekannt. Es sind besonders Retriever, Terrier und Boxer von MCT's betroffen (Tab. 5).

Tab. 5: Rassenverteilung der Hunde in der eigenen Studie

Rasse	Häufigkeit [n]
Retriever	10 (14,9%)
Terrier	8 (12,0%)
Boxer	6 (9,0%)
Berner Sennenhund (BSH)	4 (6,0%)
Weimaraner	3 (4,5%)
Deutscher Schäferhund (DSH)	2 (3,0%)
Pinscher	2 (3,0%)
Rhodesian Ridgeback	2 (3,0%)
Mischlinge	16 (23,9%)
Sonstige	13 (20,7%)

##### 4.2. Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen

Von den 74 Hunden wiesen 43 Tiere solitäre und 31 multiple MCT auf. 25 der 31 multiplen Mastzelltumore betrafen zwei Tumorlokalisationen, während sechs Hunde drei Mastzelltumoren gleichzeitig aufwiesen. Somit ergibt sich eine Gesamtzahl von 68 Mastzelltumoren innerhalb der Gruppe mit multiplen Neoplasien. Die Zuordnung aller Proben zum histologischen Grad erfolgte nach Patnaik et al. (1984) und wird in Tabelle 6 dargestellt.

Bei 6/31 Fällen mit multiplen Tumoren differierten die histologischen Grade der einzelnen Neoplasien. Bei fünf der sechs Proben lag die Variation zwischen Grad I

und II. Aufgrund der biologischen Relevanz wurden die Fälle zum größeren histologischen Grad zusammengefasst, also zu fünf Grad II Neoplasien. Eine weitere Probe variierte zwischen Grad II und III. Diese wurde folglich als Grad III Tumor deklariert. Unter den verbleibenden 26 Fällen mit multiplen Neoplasien war der Tumorgrad jeder Lokalisation identisch. Da die multiplen Fälle vor Beginn der Untersuchungen zu Probenpools zusammengefasst wurden, werden im Folgenden auch die multiplen Fälle mit mehreren identischen Tumorgraden zu einem einzigen Fall des gemeinsamen Grades zusammengefasst (Tab. 6).

Tab. 6: Histologische Grade der solitären (n=43) und multiplen (n=31) Mastzelltumore bei 74 Hunden

Grad	Solitäre [n]	Multiple [n]
I	13	13
II	11	12
III	19	6

Es wurde für 38 der 43 solitären und für 22 der 31 multiplen Neoplasien eine immunhistologische c-Kit Färbung durchgeführt (Tab. 7).

Tab. 7: Immunhistologische c-Kit Expressionsmuster der solitären (n=38/43) und der multiplen (n=22/31) Mastzelltumore

Solitäre Tumore		Multiple Tumore	
Histologie	c-Kit Muster	Histologie	c-Kit Muster
Grad I n=13	1: 6/13 2: 7/13 3: 0/13	Grad I n=9	1: 6/9 2: 3/9 3: 0/9
Grad II n=8	1: 1/8 2: 6/8 3: 1/8	Grad II n=8	1: 4/8 2: 2/8 3: 2/8
Grad III n=17	1: 1/17 2: 12/17 3: 4/17	Grad III n=5	1: 0/5 2: 1/5 3: 4/5

### 4.3. Ergebnisse der genetischen Untersuchungen

#### 4.3.1. Auswertung der Gelelektrophorese

Die Auswertung der Gelelektrophorese zeigt, dass einige Proben bei denen ein positives PCR Ergebnis vorlag, nicht korrekt sequenziert werden konnten.

Alle Proben aus der Exon 8 PCR enthielten positive PCR-Produkte. Vier dieser Proben zeigten nach der Sequenzierung kein auswertbares Ergebnis.

Elf von 16 nicht auswertbare Proben des Exon 9 enthielten positive PCR-Produkte, die jedoch in der späteren Sequenzierung kein Ergebnis zeigten.

Bei 21 der 34 letztendlich nicht auswertbaren PCR-Produkte des Exon11/12 konnte kein Untersuchungsergebnis erzielt werden, da diese Proben zwar positive PCR-Produkte enthielten, aber keine korrekte Sequenzierung stattfand. Bei vier dieser PCR-Produkte waren die Banden bereits auf dem Gel mit einem eher fraglichen als positiven Ergebnis bewertet worden und die versuchsweise durchgeführte Sequenzierung erbrachte kein auswertbares Ergebnis.

Alle weiteren nicht auswertbaren Proben der jeweiligen Exons zeigten bereits auf dem Elektrophoresegel kein positives Ergebnis und wurden nicht sequenziert.

Ein Beispiel für ein Elektrophoreseergebnis wird in Abb. 5 dargestellt.

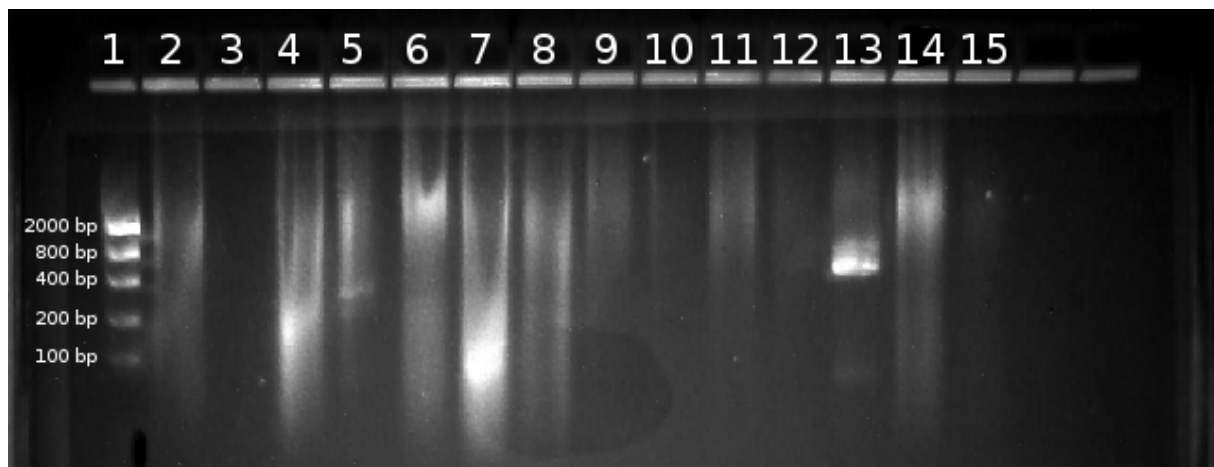


Abb. 5: Beispiel eines Gelelektrophoreseergebnisses von je zwei Proben im Exon 8, zwei Proben im Exon 9 und drei Proben im Exon 11/12 jeweils unverdünnt und in 1:10 Verdünnung

Legende: Erläuterung der Gelspuren (links beginnend): 1. Spur: DNS Marker mit Referenzbanden, 2. Spur: Probe 1 Exon 8 unverdünnt, 3. Spur: Probe 2 Exon 8 unverdünnt, 4. Spur: Probe 1 Exon 9 unverdünnt, 5. Spur: Probe 2 Exon 9 unverdünnt, 6. Spur: Probe 1 Exon 11/12 unverdünnt, 7. Spur: Probe 2 Exon 11/12 unverdünnt, 8. Spur: Probe 3 Exon 11/12 unverdünnt, Spuren 9-15 vorherige Proben in gleicher Reihenfolge in 1:10 Verdünnung, restliche Wells nicht belegt

Alle PCR-Produkte, bei denen sich eine klare Bande in der Höhe der spezifischen Länge des gewünschten Produktes einstellte, wurden als positives PCR-Produkt definiert. In Abb. 5 wäre dies lediglich in *Spur 13* der Fall. Hier ist ein als positiv zu wertendes Ergebnis zu sehen. Das Ergebnis in *Spur 5* könnte z.B. als eher fraglich ebenfalls einer Sequenzierung unterzogen werden. Alle weiteren *Spuren*, bei denen nur ein verwaschenes Ergebnis sichtbar ist, sind als negative Ergebnisse einzustufen.

#### 4.3.2. Ergebnisse der Sequenzierung im Exon 8

Es wurden insgesamt 74 Proben auf Mutationen im Exon 8 untersucht. Davon waren 70 auswertbar und vier nicht auswertbar. Es konnten keine Deletionen, Insertionen oder Duplikationen im Exon 8 festgestellt werden.

Allerdings wurde eine Basensubstitution des Nukleotids an Stelle 1303 der Coding Sequenz des c-Kit Gens identifiziert.

Bei diesem SNP-Nukleotid kann es sich um Adenin oder Guanin handeln (Tab. 8). In Tabelle 9 wird das Auftreten des SNP's in Abhängigkeit des Tumorgrades und der Tumormultiplizität dargestellt.

Der Vergleich der Aminosäureabfolgen jedes vorkommenden Genotyps ergab, dass es sich hierbei um eine stumme Mutation handelt.

Tab. 8: Genotypvariationen des Einzelnukleotid-Polymorphismus im Exon 8 der 70 kaninen Mastzelltumore

Genotyp	Anzahl [n]
AA	31 (44,3%)
GG	20 (28,6%)
AG	19 (27,1%)

Die Auftrittshäufigkeit liegt immer bei 100%, d.h. einer der Genotypen (A, G, oder A/G) des SNP's kam in jeder Probe vor.

Tab. 9: Vorkommen des SNP im Exon 8 bei solitären und multiplen MCT im Bezug auf den histologischen Grad (n=70/74)

Grad	Anzahl [n]	
	Solitär	Multipl
I n=25	13/13	12/12
II n=20	10/10	10/10
III n=25	19/19	6/6

#### 4.3.3. Ergebnisse der Sequenzierung im Exon 9

Es waren 58 der 74 Proben vom Exon 9 auswertbar und 16 ergaben kein Resultat. Im Exon 9 konnten unter den auswertbaren Proben keine Mutationen identifiziert werden.

#### 4.3.4. Ergebnisse der Sequenzierung im Exon 11/12

Von insgesamt 74 im Exon 11/12 untersuchten Proben waren 40 auswertbar und 34 nicht auswertbar.

Im Verlauf der Untersuchungen konnten keine Deletionen oder Insertionen, jedoch insgesamt drei DNS-Abschnittsduplikationen identifiziert werden.

Die erste Fall einer Duplikation (Abb. 6) trat bei einem neunjährigen, männlich kastrierten Mischling mit einem 9,0 cm großen Mastzelltumor vom histologischen Grad III im Bereich des Kopfes auf. Immunhistologisch wurde ein c-Kit Muster 2 nachgewiesen.

In Abb. 6 ist eine Überlagerung der Hauptsequenz (Primärbande) mit einer zweiten Sequenz (Sekundärbande) zu erkennen, was auf eine vorhandene Tandemduplikation schließen lässt. Die Signalbanden verfügen über eine unterschiedlich große Signalintensität.

Die Sequenzauswertung ergab, dass die identifizierte Mutation der bei Zemke et al. (2002) beschriebenen Abschnittsduplikationen 1 (Dup1) entspricht, mit der Ausnahme, dass die aktuell vorliegende Duplikation an ihrem Beginn um eine Base und an ihrem Ende um vier Basen kürzer ist, als die Literaturangabe (siehe Abb. 3).

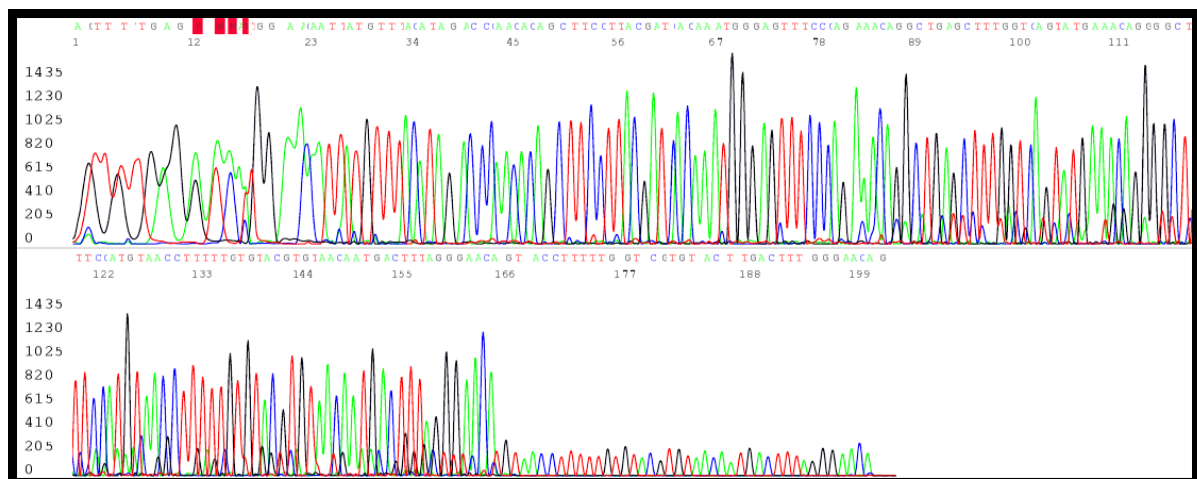


Abb. 6: Abschnittsduplikation im Exon 11 des c-Kit Gens eines Mastzelltumors eines neunjährigen, männlich kastrierten Mischling

Legende:, K: Guanin/Thymin, M: Adenin/Cytosin, R: Adenin/Guanin, S: Guanin/Cytosin, W: Adenin/Thymin

Der zweite Fall einer Abschnittsverdopplung (Abb. 7) trat bei einem männlichen, zwölfjährigen Retriever mit einem 5,0 cm großen Mastzelltumor vom histologischen Grad III im Bereich der Gliedmaßen auf. Immunhistologisch wurde ein c-Kit Muster 3 nachgewiesen.

In Abb. 7 deutet die vorhandene Überlagerung der Primärbande mit einem weiteren leicht verschobenen DNS-Abschnitt bereits die Existenz einer Duplikation an. Die Intensität beider Sequenzbande ist hier etwa gleich groß. Die Auswertung ergab, dass die vorhandene Abschnittsverdopplung der bei Zemke et al. (2002) beschriebenen Abschnittsduplikationen 5 (Dup5) entspricht, mit der Ausnahme dass die aktuell vorliegende Duplikation um vier Basen an ihrem Beginn und um fünf Basen an ihrem Ende kürzer ist als die Literaturangabe (siehe Abb. 3).

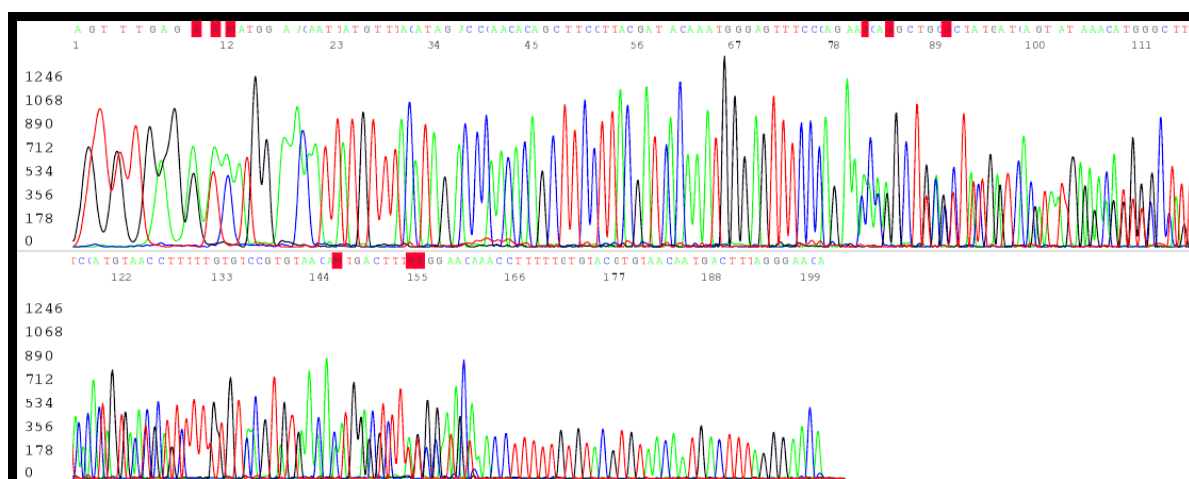


Abb. 7: Abschnittsduplikation im Exon 11 des c-Kit Gens eines Mastzelltumors eines zwölfjährigen, männlichen Retrievers

Legende: siehe Abb. 6

Der dritte Fall einer DNS-Duplikation (Abb. 8) trat bei einem männlichen, siebenjährigen Retriever mit einem 5,0 cm großen Mastzelltumor vom histologischen Grad III im Bereich des Genitals auf. Immunhistologisch wurde ein c-Kit Muster 2 nachgewiesen.

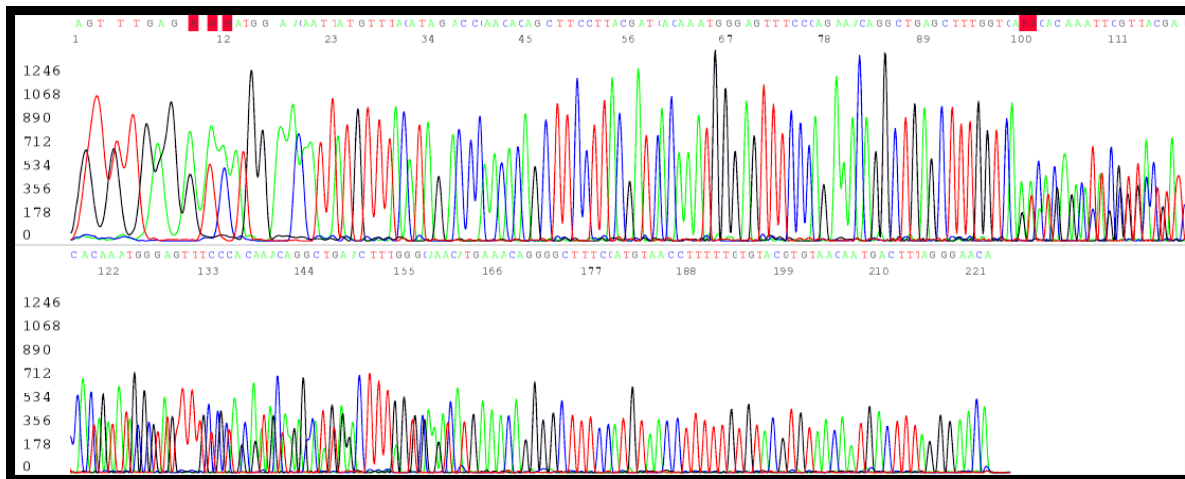


Abb. 8: Abschnittduplikation im Exon 11 des c-Kit Gens eines Mastzelltumors eines siebenjährigen, männlichen Retrievers

Legende: siehe Abb. 6

Die Intensität beider Signalbanden ist auch hier etwa gleich groß. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei dieser Tandemduplikation um die bei Zemke et al. (2002) beschriebene Abschnittduplikationen 6 (Dup6) handelt (siehe Abb. 3). Eine Abweichung der Mutationslänge vom aktuellen zum Literaturreferenzfall am Verdopplungsanfang oder -ende liegt nicht vor.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nur in 7,7% der auswertbaren Proben des Exons 11/12 eine biologisch relevante Mutation nachweisbar war (Tab. 10).

Tab. 10: Vorkommen der Tandemduplikation im Exon 11 / Intron 11 im Bezug auf die Multiplizität und den histologischen Grad der im Exon 11/12 auswertbaren Mastzelltumore (n=40/74)

Grad	Solitär (Grad I n=8, Grad II n=4, Grad III n=10)	Multipel (Grad I n=7, Grad II n=9, Grad III n=3)
I n=15	-	-
II n=12	-	-
III n=13	3/10	-

Es konnten keine signifikanten Unterschiede beim Auftreten der Duplikationen zwischen den Tumorgraden innerhalb der solitären und innerhalb der multiplen Tumore ausgemacht werden. Zudem konnten ebenfalls keine signifikanten

Unterschiede beim Auftreten der Duplikationen zwischen den solitären und den multiplen Tumoren innerhalb eines Tumorgrades nachgewiesen werden.

Neben den in erster Linie interessanten Abschnittsverdopplungen konnten zudem mehrere SNP's festgestellt werden. Die Polymorphismen traten dabei sowohl im Intron 10 und 11, sowie im Exon 11 auf. Alle SNP's wurden in Anlehnung an die Studie von Zemke et al. (2002) untersucht, identifiziert und nummeriert.

Für die Bestimmung der exakten Lokalisation des SNP6, der als einziger im expressionsrelevanten Exon 11 vorkommt, wurde die c-Kit coding Sequenz des NCBI (NM\_001003181.1) verwendet. In der coding Sequenz sind ausschließlich die letztendlich expressionsrelevanten Anteile des c-Kit Gens aufgeführt.

Eine Positionsbestimmung der Intron Basenpolymorphismen wurde aufgrund ihrer biologischen Relevanz nicht vorgenommen.

Die SNP's 2, 3, 5 und 6 werden im Folgenden in einer Tabelle (Tab. 13) zusammengefasst, da sie aus den gleichen Nukleotiden bzw. Genotypvariationen bestehen.

Es ist möglich, dass mehrere bzw. alle SNP's im gleichen Tumor auftreten, weshalb die Gesamtzahl der SNP's größer ist als die Anzahl der untersuchten Neoplasien.

Wie Tabelle 11 zeigt, können als Basen des SNP 1, im Intron 10 des c-Kit Gens, Guanin, Adenin, sowie heterozygote Varianten vorkommen.

Tab. 11: Genotypverteilung des SNP 1 im Intron 10

<b>Genotyp</b>	<b>Häufigkeit [n]</b>
AA	7 (17,9%)
GG	19 (48,7%)
AG	5 (12,8%)
Sequenz an dieser Stelle nicht auswertbar	8 (20,5%)

Neben diesem Polymorphismus konnte im Intron 11 eine weitere Einzelnukleotidsubstitution identifiziert werden. Diese liegt zwischen dem dritten und fünften SNP und wird als SNP 4 bezeichnet. Wie Tabelle 12 zeigt, kann es sich beim Genotyp dieses SNP's sowohl um Thymin, Guanin, oder die heterozygote Mischform der beiden handeln. In Tabelle 12 wird ebenfalls die Häufigkeit der aufgetretenen Substitutionen für SNP4 aufgeführt.

Tab. 12: Genotypverteilung des SNP 4 im Intron 11

Nukleotide	Auftrittshäufigkeit [n]
GG	19 (48,7%)
TT	10 (25,6%)
GT	10 (25,7%)

Die SNP's zwei, drei und fünf treten alle im Intron 11 auf. Bei den Genotypen des zweiten, dritten und fünften SNP's kann es sich um Tyrosin, Cytosin, sowie heterozygote Mischformen handeln (Tab. 13).

Der sechste identifizierte SNP befindet sich als einzige der nachgewiesenen Basenvariationen im Exon 11. Hier konnten sowohl Formen mit Cytosin, Thymin, sowie Formen mit heterozygotem Genotyp nachgewiesen werden (Tab. 13).

Dieser SNP befindet sich an 1759. Stelle der c-Kit coding Sequenz.

Tab. 13: Genotypverteilung der SNP's 2, 3, 5 und 6 im Intron 11, sowie im Exon 11 der untersuchten Mastzelltumore

Nukleotide	Anzahl [n]			
	SNP2	SNP3	SNP5	SNP 6
CC	19 (48,7%)	19 (48,7%)	12 (30,8%)	24 (61,5%)
TT	7 (17,9%)	10 (25,6%)	2 (5,1%)	5 (12,8%)
CT	13 (33,3%)	10 (25,7%)	8 (20,5%)	7 (17,9%)
Sequenz an dieser Stelle nicht auswertbar	-	-	17 (43,6%)	3 (7,7%)

Abschließend wurde in Tab. 14 eine Gegenüberstellung aller SNP Mutationen Exons 11/12 zum histologischen Grad und der Multiplizität des zugehörigen Tumors vorgenommen. Zudem erfolgte in Tab. 15 eine Gegenüberstellung der Mutationen zur Rasse des betroffenen Hundes.

Beide Auswertungen dienten der Untersuchung der Fragestellung, ob Mutationen allgemein, also unabhängig von ihrem jeweiligen Genotyp, häufiger in solitären oder multiplen Tumoren eines bestimmten Grades, oder vermehrt bei bestimmten Hunderassen auftreten.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede beim Auftreten der 6 SNP's zwischen den Tumorgraden innerhalb der solitären und innerhalb der multiplen Tumore identifiziert werden.

Weiterhin existieren auch keine signifikante Unterschiede beim Auftreten der 6 SNP's zwischen den solitären und multiplen Tumoren innerhalb eines Tumorgrades (d.h. zwischen SNP1 solitär zu SNP1 multipel, SNP2 solitär zu SNP2 multipel, usw.).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede beim Auftreten der 6 SNP's, unabhängig vom jeweiligen Genotyp, zwischen den einzelnen Hunderassen nachgewiesen werden.

Tab. 14: Häufigkeit der SNP's (unabhängig vom Genotyp) im Intron 10 / Exon 11 / Intron 11 im Bezug auf die Multiplizität und den histologischen Grad des zugehörigen Mastzelltumors unter den für das Exon 11/12 auswertbaren Proben (n=40/74)

Grad	Solitär (Grad I n=8, Grad II n=4, Grad III n=10)						Multipel (Grad I n=7, Grad II n=9, Grad III n=3)					
	SNP 1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP 1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6
I n=15	6/8	8/8	8/8	8/8	8/8	7/8	6/7	7/7	7/7	7/7	2/7	6/7
II n=12	2/4	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4	6/9	9/9	9/9	9/9	3/9	9/9
III n=13	8/10	9/10	9/10	9/10	4/10	8/10	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

Tab. 15: Häufigkeit der SNP's (unabhängig vom Genotyp) im Intron 10 / Exon 11 / Intron 11 im Bezug auf die Hunderasse für alle Hunde mit bekannter Rasse (n=67/74)

Rasse	Anzahl					
	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6
Retriever n=10	3/10	4/10	4/10	4/10	2/10	4/10
Terrier n=8	6/8	6/8	6/8	6/8	3/8	6/8
Boxer n=6	5/6	5/6	5/6	5/6	2/6	5/6
Berner Sennehund n=4	2/4	2/4	2/4	2/4	1/4	2/4
Weimaraner n=3	1/3	1/3	1/3	1/3	-	1/3
Pinscher n=2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Rhodesian Ridgeback n=2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2
Mischlinge n=16	7/16	10/16	10/16	10/16	7/16	10/16
Sonstige n=15	4/15	5/15	5/15	5/15	4/15	4/15

## **5. Diskussion**

Ziel dieser Studie war es, die bisherigen Untersuchungsergebnisse zu Mastzellneoplasien am eigenen Tiergut zu überprüfen und einen Bezug zwischen den c-Kit Mutationen, dem histologischen Tumorgrad, sowie der Immunhistologie des c-Kit herzustellen. Es wurden multiple Mastzellneoplasien in die Untersuchungen mit einbezogen, um zu untersuchen, ob diese häufiger von Mutationen betroffen sind als solitäre MCT.

### **5.1. Alters-, Rassen- und Geschlechtsverteilung im Tiergut**

Sowohl Alters-, Rassen- und Geschlechtsverteilung der in dieser Studie untersuchten Hunde stimmen mit den in der Literatur genannten Daten überein. Das mittlere Alter für Hunde mit MCT's wird mit 8 bis 14 Jahren angegeben (Kiupel et al., 2011; London & Seguin, 2003; O'Keefe, 1990; Patnaik et al., 1984) und liegt in der aktuellen Studie mit einem Mittelwert  $9 \pm 2,7$  Jahren in einem vergleichbaren Bereich. Als besonders dispositionierte Rassen für MCT werden in der Literatur Boxer, Terrier, Sennenhunde, Labradore und Golden Retriever, Schnauzer, Shar Peis und weitere genannt (Kiupel et al., 2010; Marconato et al., 2008; London & Seguin, 2003). In der eigenen Studie waren ebenfalls am häufigsten Boxer, Retriever, Sennenhunde und Terrier betroffen.

Es konnte, in Übereinstimmung mit bisherigen Studien, keine Geschlechtsdisposition festgestellt werden.

### **5.2. Diskussion der genetischen Ergebnisse**

Die mit Abstand wichtigste Beobachtung, die aus den eigenen Forschungsergebnissen hervorgeht ist, dass die in der Literatur beschriebenen Duplikationen, Deletionen und Insertionen nur in sehr geringer Zahl oder gar nicht im eigenen Untersuchungsgut aufgetreten sind.

Die prozentuale Häufigkeit der Tandemduplikationen im Exon 11 weicht stark von den Größenordnungen vergangener Studien (Letard et al., 2008; Webster et al., 2006 b; Downing et al., 2002; Zemke et al., 2002; London et al., 1999) ab. Die durchschnittliche Häufigkeit der Abschnittsduplikationen liegt in den genannten Studien bei 25,1%, im aktuellen Fall liegt sie nur bei 7,5%. Die beschriebenen Deletionen und Insertionen (Letard et al., 2008; Ohmori et al., 2008; Webster et al.,

2006 a; Webster et al., 2006 b; Downing et al., 2002; Zemke et al., 2002; London et al., 1999) kamen im aktuellen Untersuchungsgut gar nicht vor.

Es wurde erwartet, dass diese aktivierenden Mutationen besonders in den multiplen Tumorformen in erhöhtem Maße zu beobachten sind. Jedoch traten die drei aktuell identifizierten Tandemduplikationen ausschließlich in solitären Grad III Neoplasien auf. Somit kommen die Entartungen ausschließlich in schlecht differenzierten Tumoren vor, treten aber viel seltener auf als bisher beschrieben.

Der Einfluss Rezeptor-autoaktivierender Mutationen kann somit aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden. Die Zahl der aufgetretenen Mutationen ist zu gering, um eine allein darauf basierende Aussage über die Beeinflussung der Zellhistologie zu treffen. In Kombination mit den Resultaten vergangener Studien (Letard et al., 2008; Webster et al., 2006 b; Downing et al., 2002; Zemke et al., 2002; London et al., 1999) ist es hingegen möglich, einen direkten Bezug zum histologischen Grad der Tumorzellen herzustellen. Die Auswertung der zuvor genannten Arbeiten zeigt deutlich, dass Tandemduplikationen konstant in schlecht differenzierten (Grad II und III) solitären MCT vorkommen. Da auch die Verdopplungen der aktuellen Studie ausschließlich in solitären Grad III Neoplasien auftraten, scheint ein noch nicht geklärter Zusammenhang zwischen aktivierenden Mutationen und dem Entartungsgrad einzeln auftretender Tumore evident zu sein.

Eine Verbindung zwischen den DNS-Veränderungen und einer erhöhten Tumormultiplizität kann jedoch aus den gesamten Forschungsdaten nicht hergestellt werden, zumal in allen bislang durchgeführten Forschungsarbeiten nur solitäre Neoplasien als Ausgangsmaterial verwendet wurden und in der eigenen Studie nur solitäre Tumore von dieser Erbgutveränderung betroffen sind.

Somit scheinen die Mutationen nicht die primäre Ursache für die Entwicklung von höhergradigen, multiplen oder rassespezifischen Mastzellneoplasien zu sein, sie könnten jedoch aktuell noch unbekannte Auswirkungen auf das Verhalten von Mastzelltumoren haben.

Aufgrund dieser Erkenntnisse muss davon ausgegangen werden, dass auch mutationsunabhängige oder sekundäre Effekte Einfluss auf die Entstehung und den histologischen Grad multipler Tumore nehmen können. Bereits in der Studie von Ohmori et al. (2008) wurden mutationsunabhängige Aktivierungen solitärer

Mastzellneoplasien diskutiert. So könnte die Expression anderer Rezeptoren an der Zelloberfläche ein entscheidender Faktor zur Lösung dieser Frage sein.

Im Exon 8 (Letard et al., 2008) konnte der zuvor beschriebene SNP auch im vorliegenden Untersuchungsgut nachgewiesen werden, was auch für die SNP's in den Introns 10, 11 sowie im Exon 11 (Zemke et al., 2002) gilt.

Da der SNP im Exon 8 in jeder der untersuchbaren Proben auftrat, ist davon auszugehen, dass es sich um eine natürlich vorkommende Basenvariation handelt.

Im Exon 9 konnten keine Mutationen nachgewiesen werden, was an dieser Stelle eine Diskrepanz zu vergangenen Forschungsergebnissen (Letard et al., 2008) darstellt. Dort wurde zuvor ein Einzelnukleotidpolymorphismus im Exon 9 entdeckt.

### **5.3. Diskussion der verwendeten Methoden im Bezug auf die Probenauswertbarkeit**

Im Rahmen der Untersuchungen ist deutlich geworden, dass eine besonders hohe Zahl nicht auswertbarer Proben bei Untersuchungen des Exons 11/12 aufgetreten ist. 34 von 74 Proben (45,9%) waren an dieser Stelle nicht auswertbar. Unter den verbleibenden 40 Proben (54,1%) waren bei sechs untersuchten SNP's pro Probe weitere 28 Sequenzen (11,6%) nicht an allen Stellen auswertbar. Diese Tatsache steht im Gegensatz zu den Untersuchungen innerhalb der übrigen Exonabschnitte. Im Exon 8 waren lediglich 4 von 74 Proben (5,4%) nicht auswertbar, im Exon 9 lag die Quote der nicht analysierbaren DNS Sequenzen bei 16 von 74 Proben (21,6%). In beiden Exons waren unter den auswertbaren Proben alle Sequenzen an jeder Stelle der Sequenz analysierbar. Somit muss der Einfluss eventueller Fehlerquellen hinsichtlich der Probenauswertbarkeit näher eruiert werden.

Die erste Fehlerquelle, die diskutiert werden muss, sind PCR-inhibierend wirkende Rückstände, wie z.B. Formalin aus der Probenkonservierung. Formalin stört nicht nur den Ablauf der PCR-Reaktion, sondern kann das Probenerbgut regelrecht zerschneiden (Koshiba et al., 1993). Ist die DNS zu sehr angegriffen und aufgestückelt, können die Primer nicht bzw. nicht an den korrekten Stellen binden. In diesem Fall würden keine oder falsche Genabschnitte amplifiziert. Beides würde die späteren Analysenverfahren massiv beeinflussen.

Aufgrund dessen könnte sich die Effektivität der PCR extrem gemindert haben.

Um einen negativen Einfluss auf den Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion zu minimieren, wurden negative PCR Ergebnisse mit einer 1:10 verdünnten Ausgangs-

DNS in einem Wiederholungslauf nochmals einer Amplifikation unterzogen. Durch die Verdünnung sollten mögliche Inhibitorenrückstände soweit eliminiert werden, dass sie die Reaktion nicht mehr behindern konnten (Frank et al., 1996).

Zeigte sich nach mehreren Durchläufen und trotz DNS-Verdünnung weiterhin kein positives Ergebnis, musste davon ausgegangen werden, dass die DNS für Analysezwecke zu stark vom Formalin beschädigt war.

In solchen Fällen wurde komplett neue DNS aus dem archivierten Paraffinmaterial gewonnen und für die folgenden Wiederholungsläufe verwendet. Oftmals zeigten die Wiederholungsläufe nach diesen Vorgehensweisen ein positives Resultat.

In Rahmen dieser Überlegungen muss auch die Effektivität der PCR in Frage gestellt werden. Die Effektivität differiert jeweils für die Polymerase-Kettenreaktion jedes einzelnen Exons und hängt u.a. auch von den genannten Rückständen, den verwendeten Primern und der Zusammensetzung des verwendeten Mastermixes ab (Ihmann, 2004).

Obwohl der PCR Mastermix für die vorliegenden Reaktionen optimiert wurde, können dennoch Abweichungen in der Zusammensetzung beim Ansetzen des Mastermixes aufgetreten sein. So könnten Fremdstoffe, wie z.B. Salze, die Polymerase-Kettenreaktion empfindlich gestört haben (Ihmann, 2004).

Die PCR-Effektivität ist somit ein Faktor, der einen höchstwahrscheinlich großen negativen Einfluss auf die gesamten Untersuchungen hatte.

Im nächsten Schritt rückt die Gelelektrophorese in den näheren Fokus der Problemdiskussion. Wie bereits in den Ergebnissen erwähnt, konnten bei einigen Proben keine Sequenziererfolge verzeichnet werden, bei denen aber zuvor die Gelelektrophorese ein positives PCR-Produkt zeigte.

Dies war bei 21 von 35 der im Exon11/12 und bei 11 von 16 der im Exon 9 nicht analysierbaren Proben der Fall. Im Exon 8 trat das Phänomen bei vier Proben auf.

Somit ergibt sich die Frage, ob nun die Elektrophorese an sich fehlerbehaftet ist, oder ob die Fehler im Analysenverfahren in der Sequenzierung auftraten. Die Verfahren beider Methoden müssen näher beleuchtet werden.

Die elektrophoretische Trennung der DNS funktioniert anhand der spezifischen Größe und damit auch anhand des spezifischen Gewichtes jedes untersuchten Abschnittes. Die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Fehlerquelle in der Elektrophorese ist als eher gering einzustufen.

Wurde die DNS durch das Formalin in Stücke ähnlicher oder gleicher Länge wie die des zu untersuchenden Abschnitts zerschnitten, so hätten diese unspezifischen Abschnitte trotzdem keinen Einfluss auf das Elektrophoreseergebnis. Die entsprechenden Abschnitte wären im Rahmen der PCR nicht amplifiziert worden und wären somit nur in sehr geringer Konzentration im PCR Produkt vorhanden. Aufgrund der geringen Konzentration ist es unwahrscheinlich, dass derart unspezifische DNS Stücke als sichtbare Banden auf dem Elektrophoresegel aufgetreten wären. Deshalb hat dieser Fehler keinen Einfluss auf die Ausfallraten während der Untersuchungen und somit auch nicht auf die letztendlichen Untersuchungsergebnisse.

Der Gelfarbstoff war über die Dauer der gesamten Untersuchungen funktionsfähig. Selbst wenn eine Gelanalyse kein positives PCR-Resultat einer DNS-Probe an der gewünschten Position aufwies, waren die verwaschenen Anteile fremder DNS Überreste angefärbt. Der Elektrophoresefarbstoff hat ebenfalls keinen weiteren Einfluss auf die letztendliche Auswertung, da nur ein geringer Teil der PCR-Produkte für eine Gelanalyse verwendet wird und der größte Teil der positiven PCR-Ergebnisse unberührt zur Sequenzierung kommen. Somit kann der Gelfarbstoff für die weitere Fehlersuche ausgeschlossen werden.

Als nächster Schritt in der Methodenabfolge müssen Fehler während der Sequenzierung genauer diskutiert werden. Hier scheint eine besonders große Fehlerquelle zu sitzen, da viele Proben zwar in der Polymerase-Kettenreaktion „funktioniert“ haben, aber nach der Sequenzierung unbrauchbar waren. Da eine Sequenzierung im Grundprinzip der DNS-Replikation der PCR gleicht können hier die gleichen Störeinflüsse die Reaktion negativ beeinflusst haben.

So liegen die hierfür verantwortlichen Gründe wahrscheinlich in:

- 1) vorhandenen Formalinrückständen die sich in der PCR gehalten haben
- 2) Überresten der verwendeten Primer
- 3) negativen Einflüssen freier fluoreszenzmarkierter Basen
- 4) Fehlern während der Aufreinigung
- 5) Fehlern während der DNS Amplifikation im Rahmen der PCR

Zur teilweisen oder vollständigen Inhibierung einer Sequenzierung reichen bereits geringe Inhibitorkonzentrationen aus.

Überreste der PCR Primer während der Sequenzierung könnten die Reaktion ebenfalls empfindlich gestört haben (Ihmann, 2004). Für die Sequenzierung wird

erneut einer der PCR Primer als Anknüpfungspunkt für die farbstoffmarkierten Nukleotide benötigt. Im Idealfall ist in der Sequenzierung nur der Exon *Forward* oder der Exon *Reverse* Primer vorhanden. Eine DNS Amplifikation fände somit nur in eine Richtung statt. Sind allerdings Restbestände des zweiten Primers aus der PCR in größeren Mengen vorhanden, findet die Amplifikation nicht nur in die gewünschte, sondern auch in die Gegenrichtung statt. Die Folge dieses Vorganges wäre, dass man zwei unterschiedliche Sequenzen gleicher Länge erhalten würde, deren Signal sich in der späteren Auswertung überlagert. Bedingt durch die entgegengesetzte Reproduktionsrichtung der Abschnitte entsteht eine unterschiedliche Basenabfolge der sich überlagernden Sequenzen. Somit wäre es möglich, dass die interessanten Genabschnitte betroffener Sequenzierungsprodukte nicht oder nicht korrekt analysierbar waren (Ihmann, 2004).

Auch die freien farbstoffmarkierten Nukleotide (dNTPS) könnten hierbei eine Rolle spielen (Ihmann, 2004). Es kann sein, dass zufällige Verbindungen einzelner Basen zu kleineren Sequenzgruppen die DNS-Auswertung stören. Außerdem sind Hemmungsvorgänge denkbar, die eintreten, wenn die Konzentration der freien Fluoreszenznuklide zu hoch ist (Ihmann, 2004). In solchen Fällen kann die automatische Bestimmung der richtigen Basenabfolge gestört sein. Passiert so etwas in größerem Umfang, ist der Eindruck möglich, dass sich vorhandene Mutationen an Stellen befinden, an denen sich tatsächlich keine Veränderungen vorliegen. Deshalb sollte der Anteil relevanter Sequenzen in den Sequenzierungsprodukten möglichst hoch sein, um eine maximale Unterdrückung der Störsignale zu erreichen.

Zudem können hier auch Faktoren auf die Methodenerfolgsquote einwirken, die sich aus den Komponenten des verwendeten Sequenzierkits und dem Vorgehen während der Sequenzierung ergeben. So werden zur Aufreinigung der Proben mehrere Reinigungsschritte unter Verwendung spezieller Probensäulen angewendet. Hier können u.a. das Kitmaterial, Verunreinigungen des Testkits oder Verunreinigungen durch Fehler beim Pipettieren erhebliche Auswirkungen auf das Untersuchungsmaterial haben (Bessetti, 2007; Ihmann, 2004). Gelangen z.B. unspezifische DNS Polymerasen an die Untersuchungssequenzen, werden diese beschädigt oder ganz aufgelöst. Wird beim Pipettieren nicht die komplette Probe auf dem Säulenfiltereinsatz platziert, könnten ebenfalls Fremdfaktoren die gesamte Reaktion stören.

Die Anwendung des Genetic Analyzers zur Darstellung der DNS Sequenzen gibt zudem einen weiteren Hinweis darauf, welcher Faktor die Probenauswertbarkeit ebenfalls gemindert haben könnte.

Viele der erhaltenen DNS-Abschnittsdarstellungen waren an einzelnen Stellen oder teilweise über größere Abschnitte nicht auswertbar, d.h. dort haben die Farbstoffmarker nicht korrekt an die untersuchte DNS Sequenz gebunden. Da die Farbstoffe an Stellen direkt vor und nach den betroffenen Stellen richtig funktioniert haben, ist eine spontane punktuelle Dysfunktion der Marker auszuschließen. Es bleibt nur die Möglichkeit, dass an dieser Stelle keine korrekte DNS-Amplifikation im Rahmen der PCR stattgefunden hat.

Somit müsste entweder der verwendete PCR Mastermix (Bessetti, 2007; Ihmann, 2004) und das eingesetzte PCR Temperaturprofil hinsichtlich ihrer Effektivität, oder die PCR Primer im Hinblick auf ihre Spezifität und Qualität überprüft werden (Ihmann, 2004).

Diese Faktoren hätten eine Verschlechterung der DNS Ausbeute in der PCR und damit auch das Auftreten punktueller „Sequenzschäden“ zur Folge gehabt.

Aufgrund der angeführten Überlegungen liegen reine Methodikfehler, wie z.B. die Verwendung falscher Analysenverfahren in den eigenen Untersuchungen, nicht vor. Dennoch könnten die Methoden durch Einflüsse wie z.B. Inhibitorenrückstände, mangelnder Primerqualität, oder der unterschiedlichen PCR-Effektivität gestört worden sein. Das würde auch die Schwankungen der Ausfallraten erklären (Bessetti, 2007; Ihmann, 2004).

Die aus den angeführten Punkten resultierenden Verbesserungsvorschläge wären somit die Verwendung ausschließlich nativer Gewebeproben zur DNS Extraktion, um Inhibitoreinflüsse komplett auszuschließen und damit auch den Effektivitätsgrad der PCR und der Sequenzierung anzuheben

Die Verwendung unfixierter Gewebeproben würde wahrscheinlich die Auswertbarkeit und damit die Erfolgsquote der Untersuchungen insgesamt erheblich steigern.

#### 5.4. Schlussfolgerungen

Alle bisherigen Untersuchungen fanden, bis auf zwei Ausnahmen (Letard et al., 2008; Ohmori et al., 2008), ausschließlich in den USA statt (siehe Tab. 4), wobei lediglich in der Studie von Letard et al. (2008) ebenfalls Hunde aus Europa (Frankreich) mit in das Untersuchungsgut einbezogen wurden. Somit treffen alle bislang gemachten Aussagen zur Häufigkeit von kaninen c-Kit Mutationen praktisch nur auf Hunde aus den USA zu, wohingegen die aktuellen Ergebnisse erstmals einen Einblick in die c-Kit Genetik rein europäischen Tierguts bieten.

Die abschließende Auswertung der Ergebnisse der vorkommenden Mutationsarten sowie der Mutationshäufigkeit der c-Kit DNS-Veränderungen legt nahe, dass möglicherweise eine Artenvarianz zwischen amerikanischen und europäischen Hunden der gleichen Rassen vorliegt.

Die Existenz einer solchen Varianz kann mit dieser Studie jedoch nicht abschließend verifiziert werden und sollte deshalb Ziel künftiger Untersuchungen werden.

Basierend auf den vorliegenden genetischen Ergebnissen zur biologischen Relevanz der verschiedenen Mutationen kann davon ausgegangen werden, dass nur Deletionen, Insertionen und Duplikationen in der c-Kit DNS des Tyrosinkinase-Rezeptors in einem Zusammenhang mit der Entartung von Mastzellen stehen. Es ist zwar auffällig, dass alle drei Abschnittsverdopplungen innerhalb der zehn auswertbaren solitären Grad III Neoplasien aufgetreten sind, aber es besteht dennoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

Die für den histologischen Grad der Mastzellen verantwortlichen Vorgänge scheinen noch nicht vollständig verstanden worden zu sein, weshalb zukünftige Forschungsvorhaben an die Schließung dieser Verständnislücke anknüpfen sollten.

Teile der Ergebnisse wurden in folgenden Journalen publiziert und auf folgenden Veranstaltungen vorgetragen:

1. Aupperle H, A Kehl, T Irrgang, C Laik, G Loesenbeck (2011)  
Neue diagnostische Aspekte bei kaninen Mastzelltumoren – ein Überblick zur aktuelle Studienlage.  
Kleintier Konkret, S1:44-48.
2. Aupperle H, A Kehl, T Irrgang, C Laik, G Loesenbeck (2011)  
Prognosestellung beim kaninen Mastzelltumor: Welche histologischen und immunhistologischen Aspekte sind hilfreich?  
Arbeitstagung „Onkologie“ der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin der

DVG, 11.-13.02.2011 in Hofheim

Tagungsband S. 10-15

3. Aupperle H, A Kehl, T Irrgang, C Laik, G Loesenbeck (2011)

Immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen an kaninen

Mastzelltumoren.

54. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der DVG 11.-13.03.2011 in Fulda

Tierärztl Prax (G), V30, S. A

## 6. Zusammenfassung der Arbeit

**Hintergrund:** Mastzelltumore stellen eine der häufigsten Tumore beim Hund dar. Die für die Entartung vermutlich verantwortlichen Mutationen treten bei Hunden besonders in den Exons 8, 9, sowie 11/12 des c-Kit Gens auf. Besonders Insertionen, Deletionen und Duplikationen im Exon11/12 stehen im Verdacht Entartungen hervorzurufen. Es scheint zwar ein Zusammenhang zwischen diesen Mutationen und dem histologischen Grad von Mastzellneoplasien zu bestehen, aber bislang wurde keine Verknüpfung zwischen den DNS-Veränderungen und der c-Kit Immunhistologie, sowie der Multiplizität der Tumore hergestellt.

**Methoden:** Für die aktuelle Studie wurden 74 Hunde untersucht. Es wurden genetische Analysen für die Exons 8, 9, 11/12 jedes Hundes durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde genomische DNS aus formalinfixierten bzw. paraffinierten Gewebeproben gewonnen. Die so gewonnene DNS wurde mittels PCR amplifiziert und einer Auswertung mittels Sequenzierung unterzogen.

**Resultate:** Es traten insgesamt 43 solitäre und 31 multiple Tumore auf. Die histologische Graduierung der Proben ergab 26 Grad I, 23 Grad II und 25 Grad III Neoplasien. Es konnten unter allen untersuchten Hunden lediglich nur drei Duplikationen (7,5%) im Exon 11/12 festgestellt werden. Alle identifizierten Abschnittsverdopplungen fanden sich ausschließlich in solitären Grad III Tumoren. Es konnten keine Insertionen oder Deletionen nachgewiesen werden. Weiterhin wurden ein Einzelnukleotidpolymorphismus im Exon 8 und sechs weitere Polymorphismen im Exon11/12 identifiziert.

**Schlussfolgerungen:** Es konnte kein Zusammenhang zwischen c-Kit Mutationen und der Multiplizität der Tumore nachgewiesen werden. Die Studienergebnisse lassen weiterhin eine Artenvarianz zwischen amerikanischen und europäischen Hunden vermuten.

**I. Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosine triphosphate, Adenosin Triphosphat
BP	Base Pairs, Basenpaare
BSH	Berner Sennenhund
C	Cytosin
CDS	Coding Sequence
c-Kit	Cellular KIT, CD117, Tyrosinkinaserzeptor
De <sup>xy</sup>	Deletion von Nukleotidposition x bis y
Del	Deletion
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSH	Deutscher Schäferhund
DT	DT-Sequenz (nicht näher erläutert)
Dup	Duplikation
FACS	Durchflusszytometrie, fluorescent-activated cell sorting
Form.	Formalin
G	Guanin
gDNS	Genomische DNS
GE	Gelelektrophorese
HPF	High power field, Gesichtsfeld unter Verwendung eines 40er Objektivs
Ig <sup>1-5</sup>	Immunglobuläre Domäne (extrazellulärer Teil des Rezeptors)
ITD	Internal Tandem Duplication, Tandemduplikationen
JM	Juxtamembranöse Domäne
K	Guanin/Thymin
k. A.	Keine Angabe
Klon.	Klonierung
LCM	Laser Capture Microdissection, Laser-Mikrodissektion
M	Adenin/Cytosin
MCT	Mast cell tumor, Mastzelltumor
ns <sup>xy</sup>	Insertion von Nukleotidposition x bis y
Para.	Paraffin
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Q-Taq	Quiagen Taq
R	Adenin/Guanin
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
S	Guanin/Cytosin
SCF	Stem cell factor, Stammzellenfaktor, Mastzellwachstumsfaktor
Seq.	Sequenzierung
SNP	Single-Nukleotide-Polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
T	Thymin
TD <sup>xy</sup>	Tandem Duplikation von Nukleotidposition x bis y
TK1	Tyrosinkinasedomäne Abschnitt 1 (ATP Bindungsstelle)
TK2	Tyrosinkinasedomäne Abschnitt 2 (Phosphotransferasedomäne)
TM	Transmembranöse Domäne
T.Mix	Terminator Mix
W	Adenin/Thymin
WB	Western Blot
Y	Cytosin/Thymin

## II. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Histologische Graduierungskriterien von kaninen Mastzelltumoren (Patnaik et al. 1984)
- Tab. 2: Prognose von kaninen Mastzelltumoren in Abhängigkeit vom histologischen Grad (Patnaik et al. 1984)
- Tab. 3: Kriterien der c-Kit-Expressionsmuster und korrelierende Prognose für kanine Mastzelltumore nach Kiupel et al. (2004)
- Tab. 4: Übersicht über Methoden und Ergebnisse der Untersuchungen von Mutation des c-Kit Gens bei kaninen Mastzelltumoren
- Tab. 5: Rassenverteilung der Hunde in der eigenen Studie
- Tab. 6: Histologische Grade der solitären (n=43) und multiplen (n=31) Mastzelltumore bei 74 Hunden
- Tab. 7: Immunhistologische c-Kit Expressionsmuster der solitären (n=38/43) und der multiplen (n=22/31) Mastzelltumore
- Tab. 8: Genotypvariationen des Einzelnukleotid-Polymorphismus im Exon 8 der 70 kaninen Mastzelltumore
- Tab. 9: Vorkommen des SNP im Exon 8 bei solitären und multiplen MCT im Bezug auf den histologischen Grad (n=70/74)
- Tab. 10: Vorkommen der Tandemduplikation im Exon 11 / Intron 11 im Bezug auf die Multiplizität und den histologischen Grad der im Exon 11/12 auswertbaren Mastzelltumore (n=40/74)
- Tab. 11: Genotypverteilung SNP 1 im Intron 10
- Tab. 12: Genotypverteilung SNP 4 im Intron 11
- Tab. 13: Genotypverteilung der SNP's 2, 3, 5 und 6 im Intron 11, sowie im Exon 11 der untersuchten Mastzelltumore
- Tab. 14: Häufigkeit der SNP's (unabhängig vom Genotyp) im Intron 10 / Exon 11 / Intron 11 im Bezug auf die Multiplizität und den histologischen Grad des zugehörigen Mastzelltumors unter den für das Exon 11/12 auswertbaren Proben (n=40/74)
- Tab. 15: Häufigkeit der SNP's (unabhängig vom Genotyp) im Intron 10 / Exon 11 / Intron 11 im Bezug auf die Hunderasse für alle Hunde mit bekannter Rasse (n=67/74)

## III. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung des Tyrosinkinase-Rezeptors (Webster et al. 2006a)
- Abb. 2: Ablauf der Aktivierungskaskade des c-Kit Rezeptors (<http://www.megru.uzh.ch/j3/media/endo/tysinsy.gif>)
- Abb. 3: Mutationen der DNS Sequenz der c-Kit juxtamembranen Domäne der Introns 10 und 11, sowie des Exons 11 im kaninen Tyrosinkinase-Rezeptor (Zemke et al., 2002)
- Abb. 4: Lokalisation und Häufigkeit von Mutationen des gesamten Tyrosinkinase-Rezeptors bei kaninen Mastzelltumoren (Letard et al. 2008)
- Abb. 5: Beispiel eines Gelelektrophoreseergebnisses von je zwei Proben im Exon 8, zwei Proben im Exon 9 und drei Proben im Exon 11/12 jeweils unverdünnt und in 1:10 Verdünnung

- Abb. 6: Abschnittsduplikation im Exon 11 des c-Kit Gens eines Mastzelltumors eines neunjährigen, männlich kastrierten Mischling
- Abb. 7: Abschnittsduplikation im Exon 11 des c-Kit Gens eines Mastzelltumors eines zwölfjährigen, männlichen Retrievers
- Abb. 8: Abschnittsduplikation im Exon 11 des c-Kit Gens eines Mastzelltumors eines siebenjährigen, männlichen Retrievers

#### IV. Literaturverzeichnis

1. Akin, C.; Metcalfe, D. D.: The biology of kit in disease and the application of pharmacogenetics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004, 114:13-19
2. Bessetti, J.: An Introduction to PCR Inhibitors. [www.promega.com](http://www.promega.com) 2007
3. Braun, A.; Eichhorn, M.; Hagemann, R.; Köhler, G.; Lücht, J.; Schroeder, C.: Langenscheidt Fachwörterbuch Biologie Englisch. Langenscheidt Fachverlag GmbH, München; 1. Auflage 2005
4. Camps-Palau, M. A.; Leibman, N. F.; Elmslie, R.; Lana, S. E.; Plaza, S.; McKnight, J. A.; Risbon, R.; Bergman, P. J.: Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997 – 2004). *Veterinary and Comparative Oncology* 2007, 5:156–167
5. Cole, R.; Chesen, A. B.; Pool, R.; Watkins J.: Imaging diagnosis-equine mast cell tumor. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2007, 48:32-34
6. Collins, F. S.; Brooks, L. D.; Chakravarti, A.: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research* 1998, 8:1229-1231
7. Columbo, M.; Horowitz, E. M.; Botana, L.M.; MacGlashan, D. W. Jr.; Bochner, B. S.; Gillis, S.; Zsebo, K. M.; Galli, S. J.; Lichtenstein, L.M.: The human recombinant c-Kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *Journal of Immunology* 1992, 149:599-608
8. Crivellato, E.; Nico, B.; Ribatti, D.: Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. *Cancer Letters* 2008, 269:1-6
9. Dastyk, J.; Metcalfe, D. D.: Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *Journal of Immunology* 1994, 152:213-219
10. Dobson, J. M.; Scase, T. J.: Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 2007, 48:424-431
11. Downing, S.; Chien, M. B.; Kass, P. H.; Moore, P. F.; London, C. A.: Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-Kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2002, 63:1718-1723
12. Frank, T. S.; Svoboda-Newman, S. M.; Hsi, E. D.: Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed Paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagnostic Molecular Pathology* 1996, 5:220-224
13. Govier, S. M.: principles of treatment for mast cell tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 2003, 18:103-106
14. Hornick, J. L.; Fletcher, C. D.: The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Human Pathology* 2007, 38:679-687

15. Hottendorf, G. H.; Nielsen, S. W.: Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. *Zentralblatt Veterinärmedizin* 1967, 14:272-281
16. Howard, E.B.; Sawa, T.R.; Nielson, S.W.; Kenyon, A.J.: Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. *Veterinary Pathology* 1969, 6:146-158
17. Hünsler, J.; Zimmermann, H.: *Statistische Prinzipien für medizinische Projekte*. Verlag Hans Huber Hogrefe AG, Bern; 5. Auflage 2010
18. Ihmann, T.: Vergleich der pKi-67 Protein- mit der pKi-67 mRNA- Expression mittels Immunhistologie und Realtime RT-PCR in kolorektalen Karzinomen. Dissertation, Universität zu Lübeck; 2004
19. Kiupel, M.; Webster, J. D.; Kaneene, J. B.; Miller, R.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.: The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 2004, 41:371-377
20. Kiupel, M.; Webster, J. D.; Bailey, K.L.; Best, S.; DeLay, J.; Detrisac, C. J.; Fitzgerald, S. D.; Gamble, D.; Ginn, P. E.; Goldschmidt, M.H.; Hendrick, M. J.; Howerth, E. W.; Janovitz, E. B.; Langohr, I.; Lenz, S. D.; Lipscomb, T. P.; Miller, M. A.; Misdorp, W.; Moroff, S.; Mullaney, T. P.; Neyens, I.; O'Toole, D.; Ramos-Vara, J.; Scase, T. J.; Schulman, F. Y.; Sledge, D.; Smedley, R. C.; Smith, K.; Snyder, P. W.; Southorn, E.; Stedman, N. L.; Steficek, B. A.; Stromberg, P. C.; Valli, V. E.; Weisbrode, S. E.; Yager, J.; Heller, J.; Miller, R.: Proposal of a 2-Tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology* 2011, 48:147-155
21. Koshiba, M.; Ogawa, K.; Hamazaki, S.; Sugiyama, T.; Ogawa, O.; Kitajima T.: The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathology, Research & Practice* 1993, 189:66-72
22. Letard, S.; Yang, Y.; Hanssens, K.; Palmérini, F.; Leventhal, P. S.; Guéry, S.; Moussy, A.; Kinet, J.-P.; Hermine, O.; Dubreuil, P.: Gain-of-Function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research* 2008, 6:1137-1145
23. London, C. A.; Galli, S. J.; Yuuki, T.; Hu, Z. Q.; Helfand, S. C.; Geissler, E. N.: Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-Kit. *Experimental Hematology* 1999, 27:689-697
24. London, C. A.; Seguin, B.: Mast cell tumors in the dog. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice* 2003, 33:473-489
25. Lux, M. L.; Rubin, B. P.; Biase, T. L.; Chen, C.-J.; Maclure, T.; Demetri, G.; Xiao, S.; Singer, S.; Fletcher, C. D. M.; Fletcher, J. A.: KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *American Journal of Pathology* 2000, 156:791-795
26. Marconato, L.; Bettini, G.; Giacoboni, C.; Romanelli, G.; Cesari, A.; Zatelli, A.; Zini, E.: Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008, 22:1001-1007
27. Matsuda, R.; Takahashi, T.; Nakamura, S.; Sekido, Y.; Nishida, K.; Seto, M.; Seito, T.; Sugiura, T.; Ariyoshi, Y.; Takahashi, T.; et al.: Expression of the c-Kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *American Journal of Pathology* 1993, 142:339-346

28. Meininger, C. J.; Yano, H.; Rottapel, R.; Bernstein, A.; Zsebo, K. M.; Zetter, B. R.: The c-Kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 1992, 79:958-963
29. Misdorp, W.: Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Veterinary Quarterly* 2004, 26:156-169
30. Murken, J.; Cleve, H.: *Humangenetik*. Enke Verlag, Stuttgart; 4. Auflage 1988
31. Natali, P. G.; Nicotra, M. R.; Sures, I.; Santoro, E.; Bigotti, A.; Ullrich, A.: Expression of c-Kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues. *Cancer Research* 1992, 52:6139-6143
32. O'Keefe, D. A.: Canine Mast Cell Tumors. *Veterinary clinics of north america. Small Animal Practice* 1990, 20:1105-1115
33. Ohmori, K.; Kawarai, S.; Yasuda, N.; Tanaka, A.; Matsuda, H.; Nishimura, R.; Sasaki, N.; Tsujimoto, H.; Masuda, K.: Identification of c-Kit mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008, 126:43-53
34. Orkin M.: Mastocytosis in animals. *Archives of Dermatology* 1967, 96:381-385
35. Patnaik, A. K.; Ehler, W. J.; MacEwen, E. G.: Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology* 1984, 21:469-474
36. Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R.: *Biochemie*. Thieme Verlag, Stuttgart; 2. Auflage 2008
37. Roskoski, R. Jr.: Signaling by Kit protein-tyrosine kinase-the stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 337:1-13
38. Schauer, A.; Werle, E.: Zur histochemischen Darstellung des Histamins der Mastzellen. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* 1959, 131:100-104
39. Sfiligoi, G.; Rassnik, K. M.; Scarlett, J. M.; Northrup, N. C.; Gieger, T. L.: Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2005, 226:1368-1374
40. Simoes, J. P. C.; Schoning, P.; Butine, M.: Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Veterinary Pathology* 1994, 31:637-647
41. Simoes, J. P. C.; Schoning, P.: Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1994, 6:458-465
42. Stryer, L.: *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York; 4. Auflage 1995
43. Trerè, D.: AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000, 31:127-31
44. Tsai, M.; Takeishi, T.; Thompson, H.; Langley, K. E.; Zsebo, K. M.; Metcalfe, D. D.; Geissler, E.N.; Galli, S.J.: Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-Kit ligand, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991, 88:6382-6386
45. Volna, P.; Lebduska, P.; Draberova, L.; Simova, S.; Heneberg, P.; Boubelik, M.; Bugajev, V.; Malissen, B.; Wilson, B.S.; Horejsi, V.; Malissen, M.; Draber, P.: Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL. *The Journal of Experimental Medicine* 2004, 200:1001-1013

46. Webster, J. D.; Kiupel, M.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.: Evaluation of the kinase domain of c-Kit in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 2006 a, 6:85
47. Webster, J. D.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Kaneene, J. B.; Miller, R. A.; Resau, James H.; Kiupel, M.: The Role of c-Kit in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 2006 b, 8:104-111
48. Welle, M. M.; Bley, C. R.; Howard, J.; Rufenacht, S.: Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology* 2008, 19:321-339
49. Wenger, I. E.; Caron, J. P.: Tracheal mastocytosis in a horse. *Canadian Veterinary Journal* 1988, 29:563-565
50. Werle, E.; Amann, R.: Über eine Bindung des Histamins an Heparin. *Kurze Originalmitteilungen* 1955, 21:583
51. Yanagihori, H.; Oyama, N.; Nakamura, K.; Kaneko, F.: c-Kit mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *Journal of Molecular Diagnostics* 2005, 7:252-257
52. Yarden, Y.; Kuang, W.; Yang-Feng, T.; Coussens, L.; Munemitsu, S.; Dull, T. J.; Chen, E.; Schlessinger, J.; Francke, U.; Ullrich, A.: Human proto-oncogene c-Kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO Journal* 1987, 6:3341-3351
53. Yee, N. S.; Paek, I.; Besmer, P.: Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *The Journal of Experimental Medicine* 1994, 179:1777-1787
54. Zemke, D.; Yamini, B.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.: Mutations in the juxtamembrane domain of c-Kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Veterinary Pathology* 2002, 39:529-535