

Aktuelles zur pathologischen Untersuchung von Tumoren bei Hund und Katze

Teil 3: Molekulargenetische Diagnostik von Tumorerkrankungen

Dr. Heike Aupperle-Lellbach^{1,2}
Simone de Brot³
Louise von der Weyden⁴
Joshua Schwinn¹
Ines Hoffmann¹
Ondrej Skor^{1,5,6,7}
Katrin Törner¹
Alexandra Kehl^{1,2}

Die molekulargenetischen Einzel-Analysen (KIT, BRAF, PARR) sind in der Tiermedizin bereits seit längerem in der Routinediagnostik etabliert. Neu sind Multi-Gen-Mutations-Assays sowie epigenetisch basierte Verfahren, die unter dem Begriff der *Liquid biopsy* (z. B. Nukleosomen, miRNA u. a.) zusammengefasst werden. Im Vergleich zur Humanmedizin besteht jedoch noch ein hoher Forschungsbedarf. Dabei ist eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit von Klinik, Pathologie und Molekulargenetik erforderlich, um sich mit den Möglichkeiten und Grenzen der neuen Methoden vertraut zu machen.

¹ Laboklin GmbH&Co.KG, Steubenstr. 4, 97688 Bad Kissingen, Deutschland | ² Institut für Pathologie, Technische Universität München, Teglerstr. 18, 80333 München, Deutschland | ³ Institut für Tierpathologie, COMPATH, Universität Bern, 3012 Bern, Schweiz | ⁴ Wellcome Sanger Institute, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, Vereinigtes Königreich | ⁵ Regiavet s.r.o., Hrázského 2231/25, 14900 Prag 11-Chodov, Tschechien | ⁶ Vetpoint, Panónska cesta 38/A, 85104 Bratislavá-Petržalka, Slowakei | ⁷ Anima Vets, Dolné Rudiny 8730/15D, 01001 Žilina, Slowakei

Einleitung

Die Onkogenese ist ein komplizierter Prozess. In vielen Fällen sind mehrere Mutationen in verschiedenen wachstumskontrollierenden Genen nötig, bevor ein Tumor entsteht. Die Mutationen können sich über einen längeren Zeitraum aufsummieren, bevor die Zelle letztendlich unkontrolliert entartet (Gerstung *et al.* 2020). Dabei wird als Tumormutationslast (TML, engl. Tumour mutation burden TMB) die Anzahl der erworbenen Mutationen pro Megabase (Mut/Mb) im Erbgut bezeichnet, die ein Tumor im Laufe seiner

Entwicklung anhäuft. Die Veränderungen eines oder mehrerer Gene resultieren in der Bildung atypischer Proteine, die dann zu falschen oder fehlenden Signalen führen. Diese können dann eine unkontrollierte Zellteilung und somit die Entstehung eines Tumors zur Folge haben. Genetische Varianten (Mutationen) entstehen z. B. durch einen einfachen Basenaustausch (SNV – single nucleotide variation), eine Insertion (zusätzliche Basen in der Sequenz) oder eine Deletion (Verlust von Teilen der Sequenz). Auch „Splice Site“ Varianten oder Variationen der Kopienzahl (copy number variations/

alterations, CNV/CNA) sind möglich (Kehl *et al.* 2024) (Abb. 1). Diese Variationen können in den nicht-kodierenden Abschnitten der DNA, den sog. Introns auftreten, wo sie meist ohne Relevanz bleiben, da sie nicht abgelesen werden. Es gibt allerdings seltene Ausnahmen, in denen auch Veränderungen der Introns relevant sein können (Vaz-Drago *et al.* 2017; Rigau *et al.* 2019). Betreffen die Mutationen jedoch die kodierenden Abschnitte, die sog. Exons, so kann es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des resultierenden Proteins kommen.

Der Nachweis der genetischen Variationen/Mutationen erfolgt mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR). Je nach Lage und Art der Variante werden unterschiedliche Verfahren angewendet. Dazu gehören zum Beispiel eine direkte Sequenzierung, eine Real-Time PCR, eine droplet digital PCR (ddPCR), eine Fragmentlängenanalyse (FLP) oder Next generation sequencing (NGS) (Sobottka und Weber 2020; Kehl *et al.* 2024).

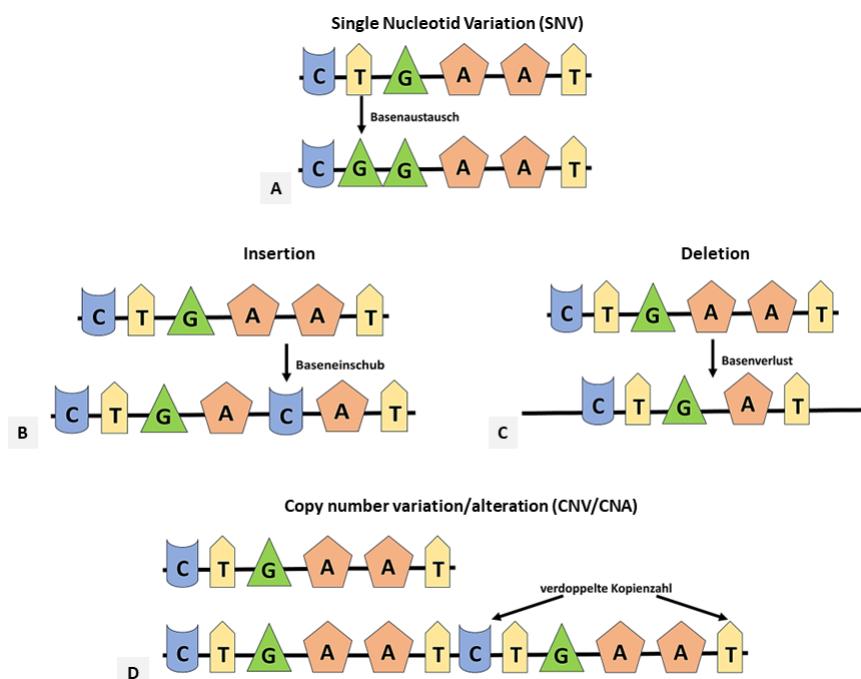
Die Sequenziertechnologie NGS hat die Humanmedizin revolutioniert, da nun die DNA-Sequenzen mehrerer Gene in einem einzigen Sequenzierungsschritt identifiziert werden können (Kehl *et al.* 2024). Dabei werden unterschieden:

- Whole Genome Sequencing (WGS): alle Gene eines Individuums werden sequenziert
- Whole Exome Sequencing (WES): alle exonischen Regionen des Genoms werden sequenziert
- Targeted Sequencing (TGS): eine bestimmte Gruppe von Genen/genomischen Regionen wird gezielt sequenziert.

Alle genannten Verfahren sind mit hohen Kosten verbunden und setzen eine moderne Geräteausstattung sowie hochspezialisiertes Personal voraus.

In der Onkogenese werden Protoonkogene und Tumorsuppressorgene unterschieden. Die Protoonkogene sind die Vorstufen der Onkogene (z. B. *RAS*, *HER2*, *BRAF*). Schädliche Einflüsse wie Chemikalien, Strahlung oder andere Noxen führen zu einer Mutation des Protoonkogens und resultieren in einer aktivierte Form, dem Onkogen. Dieses zeichnet sich durch eine erhöhte Funktionalität (*gain of function*) aus, was zu einem ungebremsten Zellwachstum führt. Als Gegenspieler fungieren die Tumorsuppressorgene (z. B. *p53*, *BRCA*). Diese verhindern physiologischerweise eine unkontrollierte Proliferation und induzieren die Apoptose. Eine Mutation, die zu einem Funktionsverlust (*loss of function*) führt, hat die Konsequenz, dass der Zellteilung keine Regulation entgegengesetzt werden kann.

Grundsätzlich lassen sich bei Hunden und Katzen die gleichen Protoonkogene und Tumorsuppressoren sowie ähnliche Mutati-



1 Schematische Darstellung von möglichen Mutationen: A) Einzelnukleotidvarianten (SNVs) entstehen, wenn ein einzelnes Nukleotid gegen ein anderes ausgetauscht wird. B) Eine Deletion, also der Verlust eines Nukleotids oder C) eine Insertion, also das zusätzliche Einfügen eines Nukleotids, führen zu einer Verschiebung des Leserasters. Insertion oder Deletion von bis zu 50 benachbarten Nukleotiden werden als Indels bezeichnet. D) Veränderungen der Kopienzahl (Copy number variations/alterations) werden durch Deletionen oder Duplikationen von größeren Chromosomenbereichen verursacht. (Nukleotide: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin)

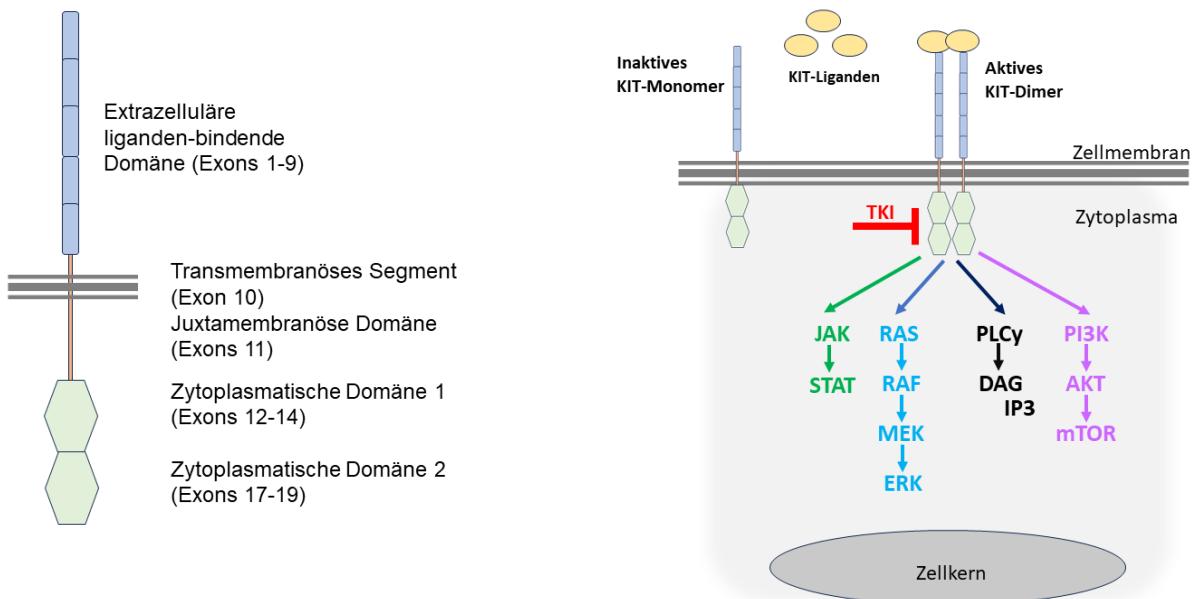
tionen dieser Gene wie beim Menschen beobachten. Eine Studie an 671 Hunden mit 23 verschiedenen Tumorarten identifizierte 18 Mutations-Hotspots, von denen acht ortholog zu menschlichen Krebs-Hotspots und klinisch verwertbar waren (Rodrigues *et al.* 2023). Interessanterweise resultieren aus gleichartigen Mutationen aber teilweise unterschiedliche Tumorarten! Daher sind umfangreiche Studien notwendig, um die speziespezifische Relevanz der jeweiligen Mutationen in den Tumorentitäten zu identifizieren.

Keimbahnmutationen

Keimbahnmutationen sind angeborene Genveränderungen, die in jeder Körperzelle nachweisbar sind. Sie werden in der Humanmedizin für Präventionsmaßnahmen genutzt. In der Tiermedizin sind nur wenige onkogenetisch relevante Keimbahnmutationen bekannt, die mit dem Auftreten bestimmter Tumore korrelieren (Aupperle-Lellbach *et al.* 2024). Bislang

stehen lediglich für vier Tumorentitäten kommerzielle Routinetests zur Verfügung.

- Für die Histiozytären Sarkome werden Mutationen in den *CDKN2A/B* Genen und Variationen auf verschiedenen Chromosomen (2, 5, 11, 14 und 20) als Risikofaktoren angesehen: v. a. bei Berner Sennenhunden aber teilweise auch Golden Retrievers, Flat Coated Retrievers und Rottweilern (Abadie *et al.* 2009; Shearin *et al.* 2012; Arendt *et al.* 2015; Hédan *et al.* 2021). Ein Markertest wird von Antagene (*Histiocytic Sarcoma Index Mate Selection*) angeboten, der für Berner Sennenhunde aus mehreren Varianten das Tumorrisko für histiozytäre Sarkome errechnet.
- Das hereditäre multifokale Nierenzystadenokarzinom und noduläre Dermatofibrose (RCND) ist ein seltes erbliches Tumor-Syndrom, das bei Deutschen Schäferhunden beobachtet wird (Moe and Lium 1997). Der RCND-Test, der von mehreren Laboren angeboten wird, analysiert mittels PCR das Vorhan-



- 2** A) Ein schematischer Überblick über den Aufbau des Rezeptors Tyrosinkinase *KIT* und B) seine Aktivierung durch den Liganden (KITLG oder Stammzellfaktor) und einige der wichtigsten Signaltransduktionswege, die zur *KIT*-induzierten Zellproliferation und zur Hemmung der Apoptose führen: Wenn *KIT* nicht an seinen Liganden gebunden ist, liegt es in der Zellmembran inaktiv vor. Die Bindung eines Liganden-Dimers an die extrazellulären Domänen bildet eine Brücke zwischen zwei benachbarten *KIT*-Molekülen, was zu einer Homodimerisierung führt. Das Ergebnis ist eine Konformationsänderung, die zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden führt. Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) blockieren die Aktivierung der Signalkaskaden.

densein der *BHD* p.H255R-Mutation im Exon 7 des Chromosom 5 (Lingaa *et al.* 2003).

- Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FTC) kann beim Hund sowohl spontan als auch als familiäre Form (FTFC) auftreten. Letztere wird insbesondere beim Deutsch Langhaar beobachtet (Yu *et al.* 2022). Der FTFC-Test, der von verschiedenen Laboren angeboten wird, identifiziert mittels PCR die beiden *TPO*-Mutationen p.F686V und p.T845M auf Chromosom 17 (Yu *et al.* 2021).
- Das Risiko für Plattenepithelkarzinome der Zehe wird über eine *KITLG* Copy number variation bestimmt. Ein CN-Wert >4 bedeutet bei schwarzen Pudeln ein erhöhtes Risiko für digitales Plattenepithelkarzinom (Karyadi *et al.* 2013). Bei schwarzen Riesenschnauzern ist ab einem CN-Wert > 5,8 ein stark erhöhtes Risiko anzunehmen (Graubereich: 4,7–5,8; < 4,7 vermindertes Risiko) (Aupperle-Lellbach *et al.* 2023). Diese Untersuchung wird bislang nur von LABOKLIN angeboten. Bei Hochrisikohunden kann ggf. eine regelmäßige medizinische Untersuchung empfohlen werden, um eine frühzeitige Behandlung

einzuleiten. Eine züchterische Beeinflussung ist auf Grund der komplexen genetischen Komposition jedoch kaum möglich. Für Riesenschnauzer und Mittelschnauzer der Farbschläge „Pfeffer & Salz“ bzw. für schwarze Mittelschnauzer liegen bislang noch keine aussagekräftigen Daten vor.

- Invasive urothiale Karzinome (iUCa) kommen bei bestimmten Rassen gehäuft vor, was eine genetische Disposition nahelegt. In amerikanischen Linien der Rasse Shetland Sheepdog konnte eine Mutation im NIPAL1-Gen als Risikofaktor bestimmt werden. Das homozygote Vorliegen dieser Mutation erhöht das Risiko für iUC um das 8-fache (Parke *et al.* 2024). Ein kommerzieller Test ist aktuell allerdings noch nicht verfügbar.

Somatische Mutationen

Somatische Mutationen sind erworbene Veränderungen im Genom, die durch verschiedene Einflüsse wie chemische Substanzen, Strahlung, elektromagnetische Wellen, Infektionen, chronische Entzündungen oder den Alterungsprozess der

Zellen entstehen. Diese Mutationen können einzelne Zellen im Organismus schädigen und schließlich zur Tumorentstehung führen. Sie sind jedoch nur in den Tumorzellen nachweisbar. Dabei werden die nachgewiesenen somatischen Mutationen entsprechend ihrer Funktionen als Biomarker in drei Gruppen unterteilt:

1. Diagnostischer Biomarker:
Eine Mutation, die in einem bestimmten Tumortyp vorkommt, und von der man annimmt, dass sie pathogen ist und (allein oder in Kombination) zur Krebsentwicklung beiträgt.
2. Prognostischer Biomarker:
Eine Mutation, die mit der Vorhersage des Behandlungserfolgs bzw. der Überlebenszeit in Verbindung gebracht wird.
3. Therapeutischer (prädiktiver) Biomarker: Eine Mutation, die mit dem Ansprechen auf eine bestimmte Therapie in Verbindung gebracht wird.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien zu somatischen Tumormutationen mit verschiedenen genetischen Verfahren (Kehl *et al.* 2024) zur Charakterisierung einer Vielzahl von Hundetumoren (Aupperle-Lellbach *et al.* 2024) durchge-

	Mensch	Hund	Katze
Mastzelltumor	systemische Mastozytose: Exon 17	ca. 20 % Exon 11 (selten Exons 8, 9, 17)	Haut: ca. 20–50 % Exons 8 und 9, (selten Exon 11); Milz: meist Exon 8
Malignes Melanom	Exon 11	15 % in Exon 11 Einzelfälle in den Exons 3, 5, 6, 7, 14, 16, 17	Auge: keine Mutation nachweisbar; andere Lokalisationen: ?
Gastrointestinaler stromaler Tumor (GIST)	Exon 11	ca. 50 % in Exon 11	1 Fallbericht: Mutation in Exon 11
Seminom	Exons 11 und 17	c-KIT ist immunhistologisch nachweisbar aber es gibt keine Mutationsstudien	keine Studien
akute myeloische Leukämie	Exons 8 und 17	selten Exon 17	keine Studien

Tab. 1: Vergleich der am häufigsten mutierten Exons des *KIT*-Gens bei verschiedenen Tumoren von Mensch, Hund und Katze (Beispiele, Literatur s. Bonkobara 2015; van der Weyden *et al.* 2020; Aupperle-Lellbach *et al.* 2024)

führt. Diese Studien leisten einen wichtigen Beitrag zum diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Fortschritt in der Veterinär-Onkologie. Bisher wurden jedoch nur vier umfangreichere Studien an Tumoren der Katze (kutane Hämangiosarkome (Wong *et al.* 2021), orale Plattenepithelkarzinome (Rodney *et al.* 2023) und urothiale Karzinome (Cheng *et al.* 2021; Wong *et al.* 2023) durchgeführt.

Multi-Gen-Tumor-Panels in der Humanmedizin

Die personalisierte/individualisierte Humanmedizin (heute besser als „stratifizierte Medizin“ bezeichnet) berücksichtigt verschiedene psychosoziale Faktoren und Biomarker (z. B. DNA, RNA, Proteine), um möglichst viele individuelle Besonderheiten von Tumorpatienten in die Auswahl der optimalen Krebstherapie (z. B. Immuntherapie oder *small-molecules*) einzubeziehen. Somatische Tumormutationen spielen daher in der Humanmedizin eine große Rolle in der Diagnostik und Therapie (Sokolenko und Imyanitov 2018; Martínez-Jiménez *et al.* 2020). Die jeweiligen Patienten werden in einem sog. interdisziplinären „Tumorboard“ individuell betrachtet und die bestmögliche Therapie für diesen einen Patienten unter Berücksichtigung aller Einflussfaktoren inkl. seiner molekulargenetischen Ausstattung diskutiert (Malone *et al.* 2020; Tamborero *et al.* 2022; Irelli *et al.* 2023). Die molekulargenetische Charak-

terisierung von Tumoren kann folglich für eine gezielte Tumorthерапie relevant sein (Aleksakhina und Imyanitov 2021). Allerdings sind bislang noch nicht für alle Tumorarten oder Subtypen entsprechende Gentests und Therapien verfügbar. Die Durchführung der Gentests ist mit hohen Kosten verbunden und erfordert einen beträchtlichen Zeitaufwand. Des Weiteren sind die Kosten für die gezielten Therapien in der Regel sehr hoch und es besteht das Risiko der Resistenzentwicklung.

Multi-Gen-Tumor-Panels in der Veterinärmedizin

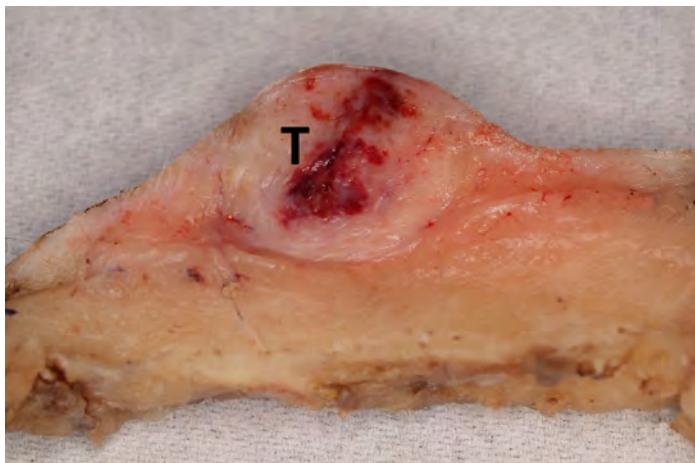
Zur Etablierung entsprechender molekulargenetischer Tumorpanels für den Hund wurde bereits umfangreiche Forschung in drei Schritten durchgeführt:

1. Im Rahmen einer systematischen Analyse wurde die Übereinstimmung von Genomsequenzen und Tumormutationen bei Mensch und Hund untersucht. Dies wird als „Kaninisierungsprozess“ bezeichnet (Sakthikumar *et al.* 2023).
 2. Die Etablierung eines relevanten Multi-Gen-Tumor-Panels für den Hund (Chon *et al.* 2023b; Chon *et al.* 2023a; Rodrigues *et al.* 2023).
 3. Die Überprüfung der klinischen Relevanz (diagnostische, prognostische, therapeutische Aussagen) der nachgewiesenen Biomarker für die Tumoren des Hundes (Chon *et al.* 2023a; Sakthikumar *et al.* 2023; Wu *et al.* 2023).
- In den USA werden bereits zwei onko-

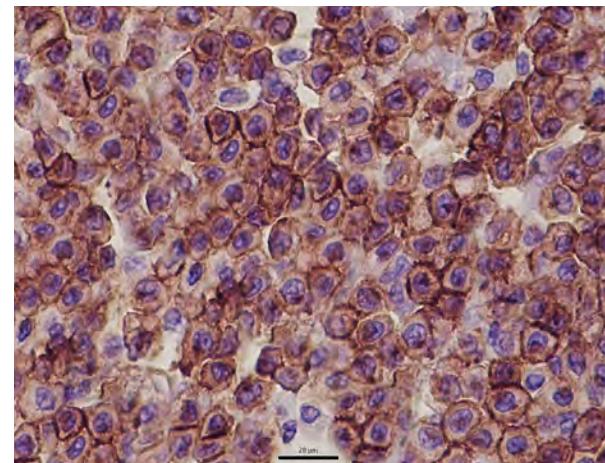
genetische Panels zur routinemäßigen Charakterisierung der somatischen Mutationen in Tumoren beim Hund angeboten. Dazu zählt beispielsweise das Mutationspanel „SearchLight® DNA“ Test von Anivive Lifesciences (Probenversand ist über LABOKLIN möglich) sowie der „FidoCure®“ Test von One Health Company, Cleveland, Ohio. Auch andere Firmen arbeiten an der Einführung solcher genetischer Tumorpanels. Für die Tumoren der Katze sind bislang keine molekulargenetischen Panels verfügbar.

Als Untersuchungsmaterial können sowohl tumorzellreiche zytologische Ausstriche als auch formalin-fixiertes-paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe verwendet werden. Die Proben dürfen nicht entkalkt oder anderweitig DNA-zerstörend behandelt sein. Die extrahierte DNA wird mittels eines für den Hund adaptierten Panels von 120 (SearchLight DNA®) bzw. 59 (FidoCure®) tumorassoziierten Genen untersucht. Die identifizierten molekularen Veränderungen werden mit der aktuellen wissenschaftlichen Literatur abgeglichen, und es wird angegeben, ob und inwieweit sie diagnostische, prognostische und/oder prädiktive Biomarker sind.

In den Befundmitteilungen werden von den jeweiligen Firmen neben der Angabe der gefundenen Biomarker auch Hinweise gegeben, welche zielgerichteten Tumor-Therapien für Menschen mit denselben genetischen Veränderungen von der FDA zugelassen sind, und somit auch für den



3 A Schnittfläche Mastzelltumor (T) am Sternum eines 7 Jahre alten Labradors (formalinfixiert).



3 B Normale perimembranöse Lokalisation des KIT-Rezeptors des Mastzelltumors (c-KIT Immunhistologie).

Hund von Nutzen sein könnten. Studien haben gezeigt, dass Hunde, bei denen Therapien, die auf den spezifischen somatischen molekularen Veränderungen basierten, eingesetzt wurden, davon deutlich profitierten (Chon *et al.* 2023b; Chon *et al.* 2023a; Wu *et al.* 2023). Selbstverständlich können die Zulassung, die Verfügbarkeit und die (meist recht hohen) Kosten der Medikamente von Land zu Land variieren. Die relative Wirksamkeit und die potenziellen Nebenwirkungen dieser Medikamente bei Hunden sind unterschiedlich gut beschrieben. Die Verantwortung für die letztlich ausgewählte Therapieentscheidung liegt immer bei den behandelnden Tierärztinnen/Tierärzten. Es wird in solchen komplexen Fällen daher dringend empfohlen, spezialisierte Onkologinnen/Onkologen zu konsultieren, wie dies auch in der Humanmedizin der Fall wäre.

Einzel-Gentests

Im Gegensatz zu den Multi-Gen-Tumor Panels, sind für Hunde einzelne somatische Tumormutationen (z. B. *KIT*, *BRAF*) bereits in der Routinediagnostik verfügbar und hinsichtlich ihrer prognostischen und/oder therapeutischen Relevanz relativ gut erforscht. Für Katzen hingegen gibt es bislang keine diagnostisch, prognostisch oder therapeutisch relevanten molekulargenetisch basierten Biomarker.

Mutationen des *KIT*-Gens

Das Protoonkogen *KIT* (syn. c-KIT, c-kit, CD117 oder Stammzellfaktor (SCF)-Rezeptor), ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), die durch das *KIT*-Gen kodiert wird. Der in der Zellmembran lokalisierte KIT-Rezeptor (Abb. 2A) besteht aus einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne (Exons 1-9), einem transmembranösen Segment (Exon 10), einer juxtamembranösen Domäne, die an der Signaltransduktion beteiligt ist (Exons 11-12) sowie zwei zytoplasmatischen Domänen (Exons 13 und 17).

KIT ist über verschiedene Signalkaskaden (Abb. 2B) unter anderem für die Hämatopoiese, die Gametogenese, die Melanogenese sowie für Mastzell-Aktivitäten von Bedeutung. Eine Dysregulation der *KIT*-Funktion fördert die Entstehung und Progression verschiedener Tumorarten. In Abhängigkeit von Spezies und Tumorart variieren die mutierten Exons des *KIT*-Gens bzw. die daraus resultierenden Neoplasien (Aupperle-Lellbach *et al.* 2024) (Tabelle 1).

Mastzelltumore Hund (Abb. 3A)

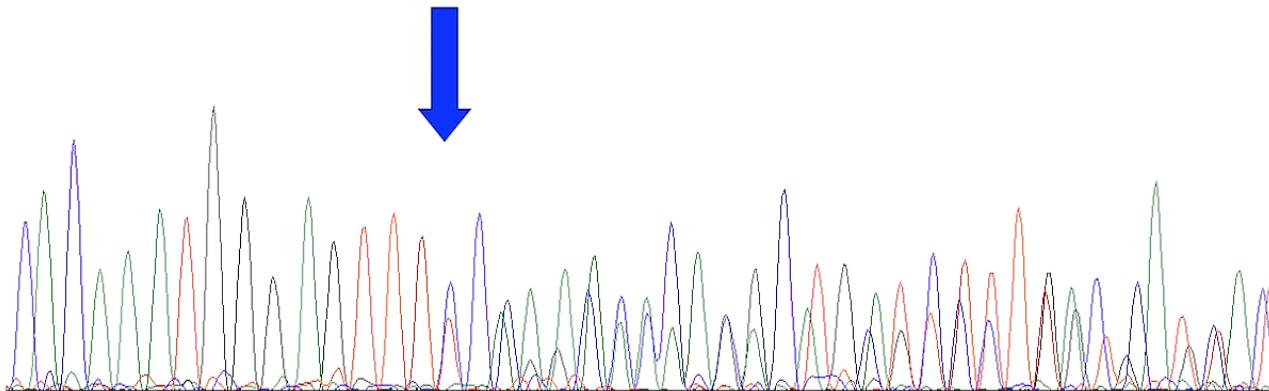
Die immunhistologischen Expressionsmuster des c-KIT-Rezeptors (Abb. 3B) erlauben eine prognostische Einschätzung von Mastzelltumoren des Hundes (Freytag

et al. 2021). Der Nachweis der *KIT*-Genmutation hat eine prognostische Relevanz und kann zur individualisierten Therapieplanung beitragen (Thamm *et al.* 2019; Bellamy und Berlato 2022; Nardi *et al.* 2022).

Der Nachweis einer *KIT*-Mutation im Exon 11 in kutanen Mastzelltumoren des Hundes (Abb. 4) ist signifikant korreliert mit einer kürzeren Überlebenszeit (Webster *et al.* 2006; Takeuchi *et al.* 2013). Dies gilt insbesondere bei höheren histologischen Graden (Mochizuki *et al.* 2017; Thamm *et al.* 2019; Vozdova *et al.* 2020). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Mutation des *KIT*-Gens (Exon 11) vorliegt, steigt mit dem histologischen Grad eines kutanen Mastzelltumors (Patnaik *et al.* 1984; Kiupel *et al.* 2011): Patnaik Grad I: 0–6 %, Grad II: 6–35 %, Grad III: 33–71 %; Kiupel low-grade: 4–13 %, high-grade: 14–52 % (Tamlan *et al.* 2020). Auch subkutane Mastzelltumoren mit einer Exon-11-Mutation sind mit größerer Wahrscheinlichkeit histologisch *high-grade* und weisen eine höhere Mitosezahl auf (Chen *et al.* 2022).

Es konnte nachgewiesen werden, dass das Ansprechen auf den Tyrosinkinase-Inhibitor Masitinib (Handelsname „Masivet®“) bei Vorliegen einer *KIT*-Mutation im Exon 11 signifikant besser ist als bei dem Wildtyp (London und Seguin 2003; Hahn *et al.* 2008; London 2009). Dies bedeutet allerdings nicht, dass bei Fehlen einer Mutati-

Start der Duplikation ITD



4 Elektropherogramm (mittels Sanger Sequenzierung erstellt) des Exons 11 des *KIT*-Gens mit interner Tandemduplikation (ITD) bei einem kaninen Mastzelltumor.

tion keine therapeutische Wirkung gegeben ist! Der Nachweis einer *KIT*-Mutation im Exon 11 in kutanen Mastzelltumoren ermöglicht eine bessere Einschätzung der Prognose sowie eine individualisierte Therapieplanung (Bellamy und Berlato 2022; Nardi *et al.* 2022). Auch andere Tyrosinkinaseinhibitoren (Abb. 2) wie Toceranibphosphat (Burton *et al.* 2015; Thamm *et al.* 2020) oder Imatinib (Bonkobara 2015) können bei Hund und Katze therapeutisch in Frage kommen (London 2014; Žagar und Schmidt 2023).

Eine Mutation im Exon 8 ist bei kaninen kutanen Mastzelltumoren mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu „Mastzelltumoren ohne Mutation“ oder „mit einer Mutation im Exon 11“ assoziiert (Brocks *et al.* 2021). Mastzelltumoren mit einer Mutation im Exon 8 sind folglich vermutlich weniger aggressiv. Eine solche Korrelation konnte bei subkutanen Mastzelltumoren mit einer Mutation im Exon 8 nicht beobachtet werden (Chen *et al.* 2022). Es gibt einen Fallbericht über einen Hund, dessen intestinaler Mastzelltumor mit einer Mutation im Exon 8 auf eine Imatinib-Therapie ansprach (Kobayashi *et al.* 2012).

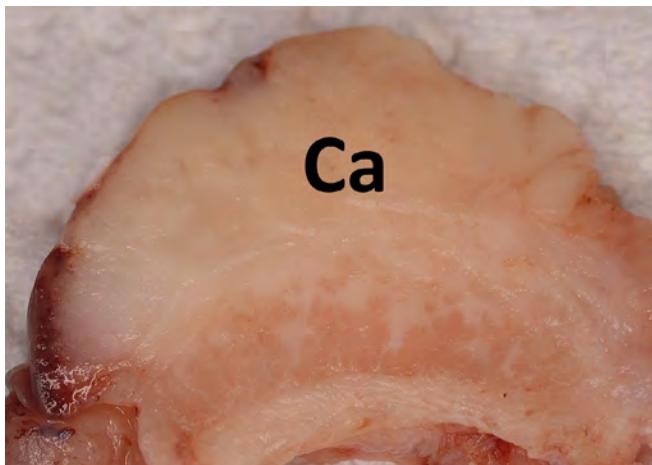
Zur prognostischen und/oder therapeutischen Aussage einer Mutation im Exon 9 in kaninen Mastzelltumoren liegen bislang keine ausreichend gesicherten Daten vor.

Gastrointestinale stromale Tumore (GIST) und Melanome des Hundes

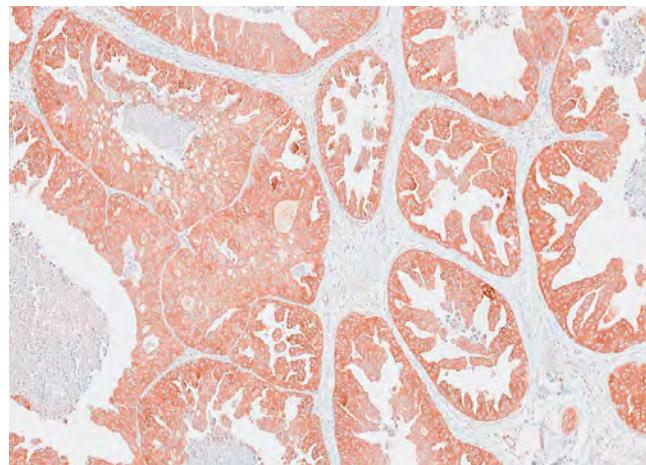
Der immunhistologische Nachweis von c-KIT wird diagnostisch genutzt, um gastrointestinale stromale Tumore und amelanotische Melanome von anderen Tumoren (z. B. Leiomyosarkome, anaplastische Karzinome) abzugrenzen. In etwa der Hälfte der GIST (Frost *et al.* 2003; Gregory-Bryson *et al.* 2010; Morini *et al.* 2022) und einem Teil der oralen Melanome des Hundes (Brocca *et al.* 2020) wurden Mutationen des Exon 11 nachgewiesen (Tab. 1). Des Weiteren wurden umfangreiche molekulargenetische Studien zu den oralen Melanomen des Hundes durchgeführt (Bowlt Blacklock *et al.* 2019; Di Palma *et al.* 2021; Giuliano 2021; Hardwick 2021; Kim *et al.* 2021b). Allerdings gibt es derzeit keine ausreichenden Daten zu dem prognostischen und/oder therapeutischen Nutzen einer *KIT*-Mutation für GIST oder maligne Melanome bei Hunden (Übersicht in: Aupperle-Lellbach *et al.* 2024). Aber im Rahmen einer individualisierten Therapie kann bei Vorliegen einer *KIT*-Mutation die Anwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren in Erwägung gezogen werden, sofern dies die jeweiligen pharmakologischen Zulassungskriterien erlauben (Wei *et al.* 2020; Smedley *et al.* 2021; Pazzi *et al.* 2022).

KIT-Mutationen in felineen Tumoren

Im Gegensatz zu den kaninen Mastzelltumoren haben die Mutationen des *KIT*-Gens (meist Exons 8 und 9) in felineen Mastzelltumoren weder einen gesicherten prognostischen noch einen therapeutischen Wert (Tab.1). Während Toceranib und Masitinib für die Verwendung bei Hunden zugelassen sind, ist noch kein Tyrosinkinaseinhibitor für Katzen zugelassen (Žagar und Schmidt 2023). Es gibt jedoch erste erfolgversprechende Fallberichte zum Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren bei der Katze (Übersicht in: Aupperle-Lellbach *et al.* 2024). In einer retrospektiven Studie an Katzen mit kutanen, viszeralen oder gastrointestinalen Mastzelltumoren, die mit Toceranib behandelt wurden, war in 40/50 (80 %) Fällen ein klinischer Nutzen zu erkennen (Berger *et al.* 2018). Allerdings wurde in dieser Studie der *KIT*-Mutationsstatus der Tumore nicht untersucht, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob die Mutation einen prädiktiven Wert hat. Auch zum Nutzen der *KIT*-Mutationsnachweise bei GIST oder Melanomen der Katze gibt es bislang keine aussagekräftigen Daten. Allerdings existieren bereits vergleichende molekulargenetische Studien zu felineen Melanomen (van der Weyden *et al.* 2016; Wong *et al.* 2019).



5 A Schnittfläche eines infiltrativ wachsenden urothelialen Karzinoms (Ca) in der Harnblase einer 13 Jahre alten Mischlingshündin (formalinfixiert).



5 B Urotheliales Karzinom in der Harnblase einer 9 Jahre alten kastrierten Cocker Spaniel Hündin. Die Immunhistologie für BRAF V595E zeigt die diffuse Expression des mutierten Proteins in den neoplastischen Zellen.

BRAF-Mutation

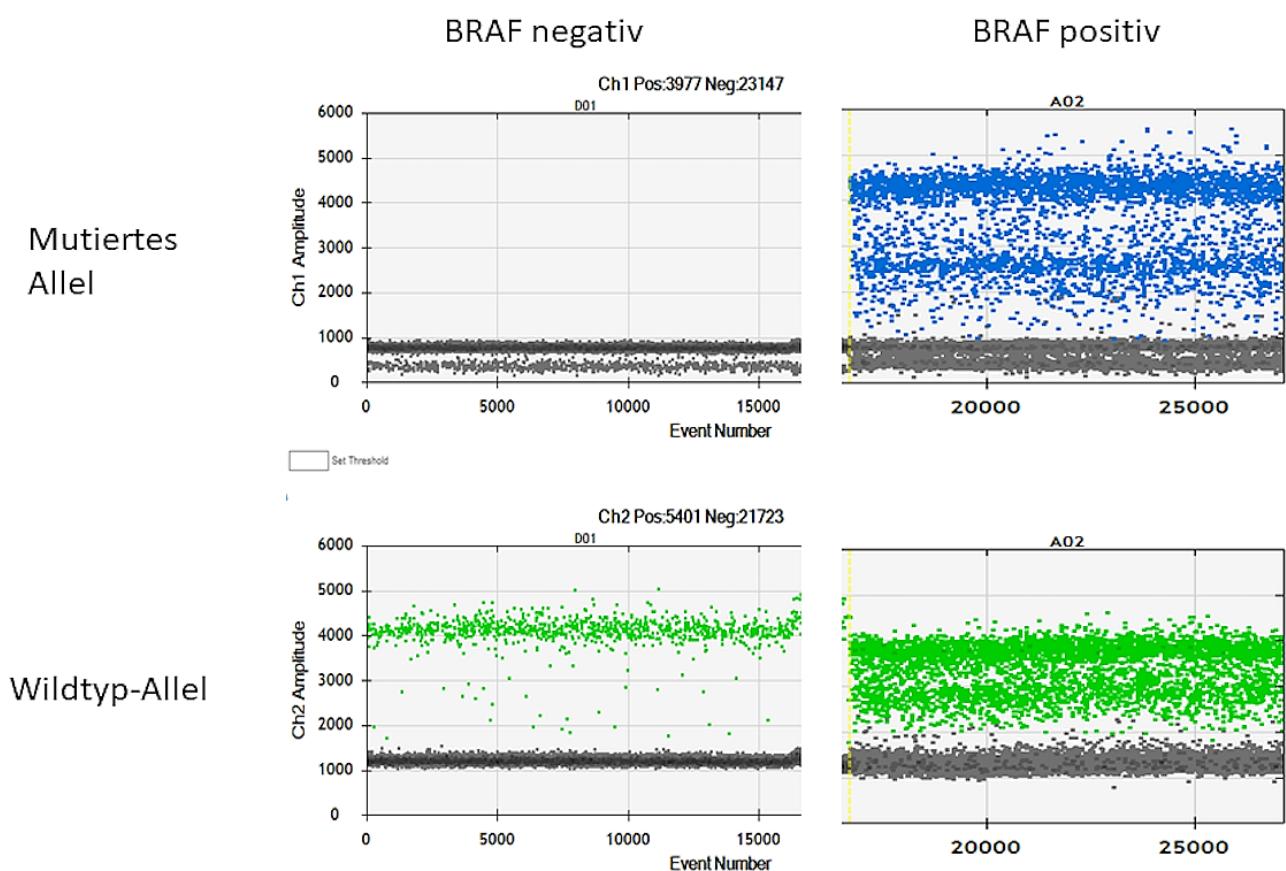
BRAF gehört zur RAF-Familie (*Rapid Accelerated Fibrosarcoma*), einer Gruppe zytosolischer Serin/Threonin-Kinasen (Abb. 2B), zu denen ARAF, BRAF und CRAF gehören. Sie sind Teil des Signalleweges der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) (Übersicht in: Zehir *et al.* 2017). Obwohl alle drei RAF-Kinasen in normalen Säugetierzellen eine wichtige Rolle spielen, ist vor allem BRAF bei der Onkogenese relevant. Das mutierte BRAF-Protein hat eine 500-700-fach höhere Kinase Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-BRAF-Protein (Wan *et al.* 2004). Beim Menschen ist die BRAF p.V600E-Mutation die häufigste RAF-Mutation (46 %), die insbesondere in Fällen mit Haarzellenleukämie (72 %), Schilddrüsenkrebs (45 %), Melanom (36 %), Histiozytose (19 %) oder Darmkrebs (12 %) auftritt (AACR Project GENIE Consortium 2017; Zehir *et al.* 2017). Niedermolekulare BRAF-Inhibitoren (BRAFi), z. B. Vemurafenib, Dabrafenib, Sorafenib und Encorafenib werden für die Behandlung von Patienten mit BRAF-mutierten Tumoren eingesetzt, da sie selektiv auf BRAF abzielen. Sie greifen in den MAPK-Signalweg (Abb. 2b) ein, der die Vermehrung und das Überleben der Tumorzellen reguliert (Poulikakos *et al.* 2022). Beim Hund führt eine Nukleotidsubstitution von T zu A an Position 1349 des

BRAF-Gens zu einer Aminosäuresubstitution von Valin (V) zu Glutaminsäure (E) an Position 595 des BRAF-Proteins (auch bekannt als BRAF p.V595E bei Verwendung des kanonischen Transkripts ENSCAFT00000006305.5). Dies ist das Äquivalent der BRAF p.V600E-Hotspot-Mutation in menschlichen Tumoren (Decker *et al.* 2015).

Die BRAF p.V595E-Mutation auf dem Chromosom 16 wurde in 40–87 % der urothelialen Karzinome (UCa, Abb. 5A) und 60–85 % der Prostatakarzinome (PCa) von Hunden festgestellt (Decker *et al.* 2015; Mochizuki *et al.* 2015a; Mochizuki *et al.* 2015b; Mochizuki und Breen 2015). Im Gegensatz zum Menschen tritt die BRAF p.V595E-Mutation bei anderen Tumortypen beim Hund selten auf (Mochizuki und Breen 2015). Es handelt sich beim Hund um eine rein somatische Mutation – sie wurde nicht in Keimbahnproben von Hunden mit UCa gefunden (Decker *et al.* 2015). Diese Mutation ist in nicht-neoplastischem Blasen- und Prostatagewebe (z.B. Zystitis, Polypen, Prostatitis, Prostatahyperplasie) nicht nachweisbar (Mochizuki *et al.* 2015b; Aupperle-Lellbach *et al.* 2018; Grassinger *et al.* 2019a). Interessant ist, dass die BRAF p.V595E-Mutation mittels ddPCR in einer Urinprobe eines Hundes mit folliculärer Zystitis und einer flachen urothelialen Läsion mit Atypien bereits detektiert werden konnte (Chambers *et al.* 2023). Dies deu-

tet darauf hin, dass es ein Kontinuum von der Dysplasie über das *Carcinoma in situ* bis zum invasiven Karzinom gibt, in dem die Mutation des BRAF-Gens ein frühes treibendes Ereignis sein kann. Dies ist diagnostisch für die Früherkennung relevant. Die Mutation des BRAF-Gens ist übrigens nicht nur molekulargenetisch nachweisbar, sondern kann auch immunhistologisch (Abb. 5B) über den Nachweis des veränderten BRAF-Proteins visualisiert (Aeschlimann *et al.* 2024) und mittels KI gestützter digitaler Bildanalyse detektiert (Küchler *et al.* 2023) werden.

Interessanterweise ist die Inzidenz der BRAF p.V595E-Mutation bei kaninen urothelialen Karzinomen von der Rasse abhängig (Aupperle-Lellbach *et al.* 2019; Grassinger *et al.* 2019b, Törner *et al.* 2024). So ist die Häufigkeit dieser Mutation bei einigen Terrierrassen besonders hoch (Decker *et al.* 2015; Aupperle-Lellbach *et al.* 2019). Eine aktuelle Studie aus dem Routinematerial der letzten 5 Jahre von LABOKLIN hat außerdem einen besonders hohen Anteil positiver Ergebnisse bei Proben von Beagles und Shetland Sheepdogs (im Vergleich zum Mischling) ergeben (Törner *et al.* 2024). Da diese Rassen außerdem eine Prädisposition für die Entwicklung urothelialer Tumoren aufweisen, kann der Urintest bei diesen Hunden als Screeningtest zur Früherkennung genutzt werden (Mutsaers *et al.* 2003). Obwohl die Inzidenz bei anderen



6 Ergebnisse einer ddPCR-Analyse für eine Probe ohne BRAF V595E Mutation (links) und mit Mutation (rechts). In der oberen Zeile ist der Nachweis des Allels mit der Mutation dargestellt (schwarze Punkte sind negative Tröpfchen, blaue Punkte (rechter Fall) sind positive Tröpfchen mit Mutation). In der unteren Zeile ist der Nachweis des Wildtyp-Allels (ohne Mutation) dargestellt (schwarze Punkte sind negative Tröpfchen, grüne Punkte sind positive Wildtyp-Tröpfchen, die in beiden Proben vorkommen).

Hunderassen deutlich geringer ist (~40–50 % der Fälle der UCa), kann sie dennoch als erster, nicht-invasiver diagnostischer Schritt hilfreich sein (Aupperle-Lellbach *et al.* 2018).

Der Nachweis der *BRAF*-Mutation (Abb. 6) hat diagnostische Relevanz, wenn eine aussagefähige Zytologie oder Biopsie nicht möglich sind (z. B. aufgrund von Narkoserisiken, limitiertem Zugang zu Ultraschallgeräten, Bedenken der Tierhalter, Kosten oder nicht auswertbaren Proben). Der Wunsch nach einem nicht-invasiven Verfahren zur Tumordiagnose von urothelialen Karzinomen führte dazu, dass die *BRAF* p.V595E-Mutation in neoplastischen Zellen oder zellfreier DNA (cfDNA) nun auch im Urin von Hunden mit UCa routinemäßig nachgewiesen werden kann.

Die droplet digital PCR (ddPCR) ist sehr sensitiv und kann auch quantifizieren, wie viele Zellen (v. a. im Urin) untersucht wur-

den, was für die diagnostische Sicherheit relevant ist. Grundsätzlich gilt jedoch, dass lediglich ein positiver Tumorbefund beweisend ist (Aupperle-Lellbach *et al.* 2018). Ein negativer Befund kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein:

- 1) Es handelt sich um ein Karzinom, welches keine *BRAF*-Mutation aufweist.
- 2) Es handelt sich um ein Karzinom, von dem keine mutierten Zellen in der Probe vorhanden waren.
- 3) Es handelt sich nicht um ein Karzinom.

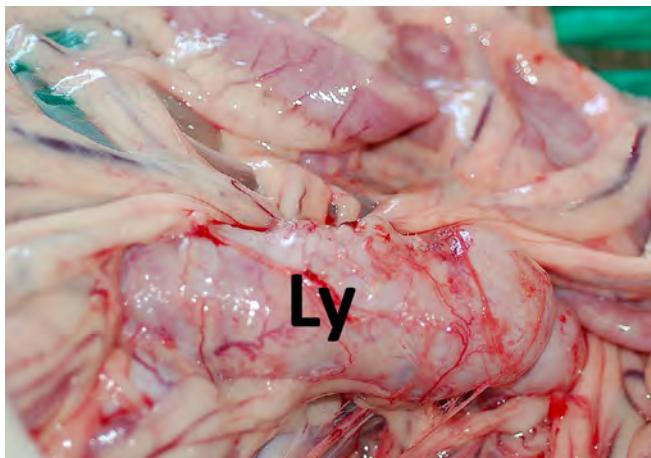
Um auch urothiale Karzinome des Hundes zu identifizieren, die keine *BRAF*-Mutation aufweisen, kann das Vorliegen einer *Copy Number Alteration* (CNA) bestimmt werden, die in den Chromosomen 13, 19 und/oder 36 vorkommen kann. Diese sind unabhängig von der *BRAF*-Mutation (Shapiro *et al.* 2015; Mochizuki *et al.* 2016; Wong *et al.* 2023). Sie stellen

ein molekulargenetisches Phänomen dar und wurden bislang nur in kaninen urothelialen Karzinomen aber nicht in Prostatakarzinomen gefunden.

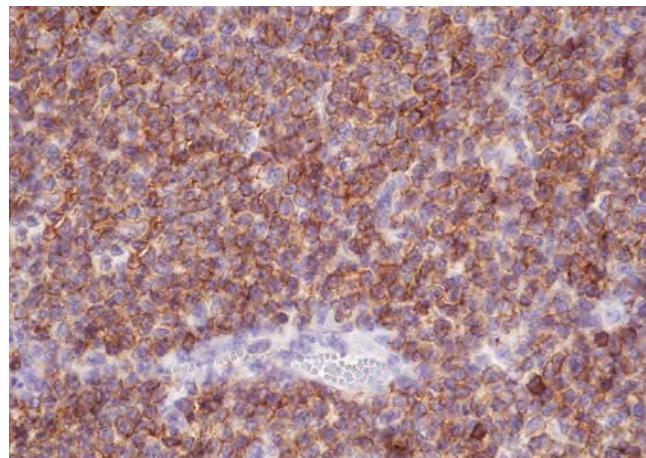
In >75% der urothelialen Karzinome kann man in den Chromosomen 13 und 36 eine Vervielfältigung und/oder auf Chromosom 19 einen Verlust von Gensequenzen beobachten, wobei >93 % der Karzinome mindestens zwei dieser CN-Veränderungen aufweisen (Shapiro *et al.* 2015; Mochizuki *et al.* 2016). Die molekularen Konsequenzen dieser CNA auf Proteinebene oder innerhalb von Signal-Kaskaden sind noch nicht untersucht. Sie haben daher ausschließlich diagnostischen, aber bislang keinen prognostischen oder therapeutischen Wert.

Urinproben von Hunden mit Harnwegsinfektionen, Zystitis oder gutartigen Blasenpolypen wiesen diese CNA nicht auf (Mochizuki *et al.* 2016).

CNA-Untersuchungen zur Diagnose



7 A Lymphom im Mesenteriallymphknoten (Ly) eines 8 Jahre alten Collie-Rüden. ©Dres. Staudacher, AniCura Aachen



7 B T-Zell Lymphom im Darm einer 8 Jahre alten Europäisch-Kurzhaar-Katze (Immunhistologie, CD3).

eines urothelialen Karzinoms werden in den USA von Antech unter dem Namen CADET® BRAF-PLUS angeboten (Wiley *et al.* 2019). Seit Juli 2024 wird die kombinierte Untersuchung von *BRAF* und der CNAs auf den Chromosomen 13, 19 und 36 unter der Bezeichnung „BRAF comp.“ von LABOKLIN GmbH & Co KG angeboten. Im Gegensatz zur *BRAF*-Mutationsanalyse ist für die CNA-Untersuchungen eine bessere DNA-Qualität erforderlich. Entzündungszellen sollten das Bild nicht dominieren, da es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann, wenn die Anzahl normaler Genkopien aus den Entzündungszellen die Anzahl abweichender Genkopien der Tumorzellen überdeckt (Mochizuki *et al.* 2016).

Grundsätzlich wäre ein Monitoring des Krankheitsverlaufs (Tumorwachstum, Metastasierung) eines kaninen urothelialen Karzinoms möglich, indem die Menge an *BRAF* p.V595E in der zirkulierenden Tumor-DNA im Blut (ctDNA) bestimmt wird (Tagawa *et al.* 2019; Kim *et al.* 2021a). Vor einem Einsatz in der Routinediagnostik sind jedoch weitere Validierungen erforderlich. In zwei Studien zur prognostischen Relevanz der *BRAF*-Mutation in kaninen Übergangsepithelzellkarzinomen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Überlebenszeit von Hunden mit bzw. ohne *BRAF*-Mutation im Tumor festgestellt werden (Pantke *et al.* 2019; Gedon *et al.* 2022).

Hinsichtlich einer therapeutischen Relevanz der *BRAF*-Mutation konnte gezeigt werden, dass das Überleben von Hunden mit Harnblasentumoren signifikant von dem gewählten Behandlungsschema abhängt, sofern eine *BRAF*-Mutation vorliegt: Hunde, die metronomisch Chlorambucil nach Mitoxantron erhielten, erreichten eine mehr als doppelt so lange mediane Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten, die nur Mitoxantron erhielten (588 versus 216 Tage, $p = 0,030$). Im Gegensatz dazu wurden solche Unterschiede nicht beobachtet, wenn ein urothiales Karzinom ohne *BRAF*-Mutation vorlag (Gedon *et al.* 2022).

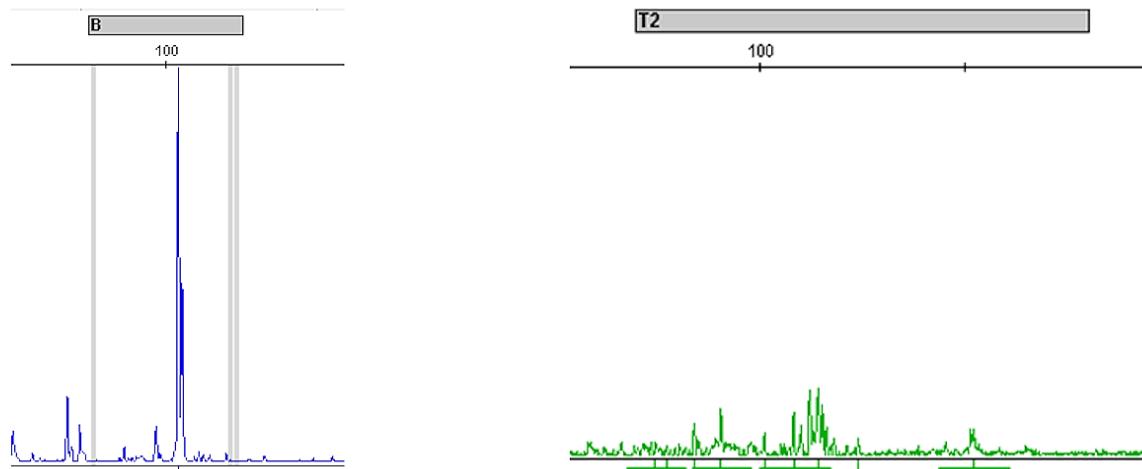
In der Humanmedizin werden *BRAF*-Kinase-Inhibitoren therapeutisch eingesetzt. Diese Medikamente sind in Deutschland noch nicht für den Hund zugelassen. Jedoch könnten sich in Zukunft therapeutische Optionen eröffnen, da erste erfolgversprechende Studien vorliegen.

Vemurafenib wird in der Humanmedizin beispielsweise zur Behandlung von Melanomen mit der *BRAF*-V666E-Mutation genutzt. *In-vitro*-Studien mit *BRAF*-p. V595E-UC-Zelllinien von Hunden haben hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Vemurafenib (PLX4032) im Vergleich zu humanen Zelllinien gemischte Ergebnisse gezeigt (Jung *et al.* 2021; Cronise *et al.* 2022). In einer klinischen Phase-I/II-Studie mit Vemurafenib bei Hunden mit *BRAF*-mutiertem UCa wurde

festgestellt, dass die Sicherheit, die Anti-Tumoraktivität, und die pharmakodynamischen Auswirkungen von Vemurafenib auf die Haut denen beim Menschen entspricht (Rossman *et al.* 2021).

Allerdings wiesen die untersuchten kaninchen UCa-Zelllinien eine hohe Sensitivität gegenüber Sorafenib (BAY 43-9006) auf, einem Multi-Kinase-Inhibitor, der auf zahlreiche Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen (*BRAF*, *RAF1*, *PDGFR*, *VEGFR1-3*, *KIT*, *FLT3*, *FGFR1* und *RET*) wirkt (Jung *et al.* 2021). Eine Studie zur Verträglichkeit von Sorafenib bei Hunden (darunter drei mit UCa) ergab, dass Sorafenib gut vertragen wurde (keine unerwünschten Wirkungen) und 4 Wochen lang kein Fortschreiten der Krankheit festgestellt wurde (Foskett *et al.* 2017). Insofern kann der *BRAF*-Mutationsstatus bei Hunden als potenzielle neue therapeutische Strategie für eine individualisierte Behandlung betrachtet werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Behandlung mit *BRAF*-Inhibitoren mit hohen Kosten verbunden ist und unbedingt in die Hände von erfahrenen Onkologinnen und Onkologen gehört.

Leider weisen die urothelialen Karzinome der Katze keine *BRAF* Mutation und auch sonst keine genetischen Variationen auf, die als diagnostische, prognostische oder therapeutische Biomarker verwendet werden könnten (Wong *et al.* 2023).



8 GeneScanning Ergebnisse eines B-Zelllymphoms. Das Vorhandensein des einen blauen Peaks (links) weist auf ein monoklonales Ergebnis für die IgH-Gene (relevant für B-Lymphozyten) hin, während die vielen kleinen Peaks in grün ein polyklonales Muster für die TCR-Gene (T-Lymphozyten) anzeigen.

Klonalitätsanalyse (PARR)

Die PCR für Antigenrezeptor-Rearrangement (PARR) stellt einen molekularen Test dar, dessen Ergebnis als diagnostischer Biomarker für Lymphome bei Hunden und Katzen (Abb. 7a+b) verwendet wird. Insbesondere zur Bestätigung bei unklaren Fällen aber auch als Hilfe zur Differenzierung von B- und T-Zell-Lymphomen kann dieses Verfahren herangezogen werden (Aupperle-Lellbach *et al.* 2024; Kehl *et al.* 2024).

Die PARR lässt sich an zytologischen Ausstrichen, FFPE-Gewebe, Ergussflüssigkeiten oder Liquor cerebrospinalis durchführen. Sie hat das Ziel, die Diagnose eines Lymphoms zu stellen bzw. zu erhärten und kann bei der Differenzierung helfen, ob es sich um ein B- oder T-Zell-Lymphom handelt (Burnett *et al.* 2003; Gentilini *et al.* 2009; Burkhard und Bienzle 2013). Die Indikationen für die Anwendung der PARR sind: 1) Verdacht auf Leukämie oder Lymphom aus klinischer Sicht oder anhand eines (Blut)Ausstrichs mit tumorverdächtigen Zellen; 2) ein unklares immunhistologisches Ergebnis (z. B. gemischtes Bild bei Verdacht auf T-zellreiches B-Zell-Lymphom); 3) ungeeignetes Gewebe für die Immunhistologie (schlechte Qualität oder follikuläre Proliferation (Sabattini *et al.* 2018).

Die PARR-Analyse weist keine somatischen Mutationen nach, sondern identifi-

ziert natürlich vorkommende somatische Rearrangements von Antigenrezeptor-genen, die während der Entwicklung/Reifung von Lymphozyten auftreten. Die B-Lymphozyten ordnen die Gene für die schwere Kette des Immunglobulins (IgH)-Gens um, während T-Lymphozyten die Gene für den T-Zell-Rezeptor (TCR) neu arrangieren, um die charakteristische Diversität der Antigenrezeptoren zu erreichen (Vernau und Moore 1999; van Dongen *et al.* 2003). Jede dieser Zellen verfügt über einen einzigartigen Rezeptor. Nach der Aktivierung durch ein spezifisches Antigen kommt es zu einer Proliferation der Lymphozyten, welche in normalen lymphatischen Geweben zu einer polyklonalen Population mit einer großen Vielfalt von B- und T-Zellen führt. Im Falle von Lymphomen hingegen entstehen die bösartigen lymphatischen Zellen aus einem einzigen Klon, nämlich einer B- oder T-Zelle, die sich unkontrolliert vermehrt. Daher wird die PARR-Analyse als diagnostisches Verfahren verwendet, um die Klonalität der B- und/oder T-Zellpopulationen einer Probe zu analysieren (van Dongen *et al.* 2003; Gentilini *et al.* 2009; Keller und Moore 2012; Langerak *et al.* 2012; Hammer *et al.* 2017).

Bei der PARR-Analyse werden mittels PCR selektiv die variablen Regionen von Antigenrezeptorgenen, wie z. B. die verschiedenen IgH- oder TCR-Gene, ampli-

fiziert und anschließend vergleichend analysiert wobei man sich die unterschiedliche Länge der jeweiligen Gensegmente zu Nutze macht (van Dongen *et al.* 2003). In gesunden Proben lässt sich eine Vielzahl von PCR-Produkten nachweisen, die das breite Spektrum der Genumlagerungen widerspiegeln (eine „polyklonale“ Population). Im Gegensatz dazu kann das Vorhandensein eines einzigen PCR-Produkts, das als „monoklonale Population“ bezeichnet wird, ein Hinweis auf eine klonale Expansion sein, was auf das Vorhandensein eines Lymphoms hindeutet (Abb. 8). Gegebenenfalls muss dieser monoklonale Peak vor dem Hintergrund einer noch vorhandenen normalen Rest-Lymphozytenpopulation interpretiert werden. Manchmal sind auch biklonale Proliferationen zu beobachten (van Dongen *et al.* 2003; Gentilini *et al.* 2009; Keller und Moore 2012; Langerak *et al.* 2012; Hammer *et al.* 2017). Es sei darauf hingewiesen, dass die PARR-Diagnostik gewisse Einschränkungen aufweist: Es besteht die Möglichkeit, dass keine DNA aus dem eingesandten Material isoliert werden kann. Dies kann insbesondere bei Formalin-fixiertem Gewebe auftreten, da Inhibitoren vorhanden sein können (Kehl *et al.* 2024).

Ein falsch-negatives Ergebnis bedeutet, dass der Hund oder die Katze ein Lymphom hat, aber die PCR nicht das Muster einer monoklonalen Population zeigt. Ursachen für falsch-negative Ergebnisse

können sein (Keller *et al.* 2016):

- 1) Es sind nicht ausreichend relevante Zellen in der Probe.
- 2) Die verwendeten Primerpaare decken das Gen-Rearrangement des neoplastischen Lymphozytenklos nicht ab.
- 3) Mutationen in den Primerbindungsstellen aufgrund von natürlich vorkommenden Hypermutationen oder Chromosomenaberrationen verhindern die Bindung des Primerpaars.

Falsch positive Ergebnisse können auftreten, wenn eine monoklonale Proliferation (ohne Vorliegen einer Neoplasie) erfolgt: z. B. aufgrund einer antigenen Stimulation als Teil der normalen Immunreaktion, wie es nach einer Infektion mit *Leishmania infantum* (Gentilini *et al.* 2009; Melendez-Lazo *et al.* 2019) oder *Ehrlichia canis* (Burnett *et al.* 2003) beschrieben wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die Integration von klinischen, morphologischen und immunphänotypischen Informationen unerlässlich ist und die PARR niemals als alleiniges molekulares Diagnoseinstrument verwendet werden sollte (Keller und Moore 2012; Langerak *et al.* 2012; Burkhardt und Bienzle 2013; Gress *et al.* 2016; Keller *et al.* 2016).

Liquid biopsy

Bei dem Schlagwort „*Liquid biopsy*“ handelt es sich um einen Sammelbegriff, der verschiedene Methoden der molekularbiologischen Tumordiagnostik im Blut aber auch in anderen Körperflüssigkeiten (wie Urin, Speichel, Bronchiallavage, Liquor etc.) umfasst (Jung und Kirchner 2018). Je nach Fragestellung werden die unterschiedlichsten Parameter detektiert, wie zum Beispiel:

- Zirkulierende (epitheliale) Tumorzellen (CTCs, CETCs)
- Zirkulierende zellfreie Tumor-DNA (ctDNA, cfDNA)
- Nukleosomen
- MicroRNAs (miRNA, miR)
- Extrazelluläre Vesikel (EV) wie Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Vesikel
- Molekulare Marker in Thrombozyten (*Tumor-Educated Platelets*)

Während die auf Mutationen basierenden

Methoden (CTC, cfDNA) neben der Diagnostik auch prognostische und therapeutisch relevante Informationen liefern, dienen die meisten epigenetischen Verfahren (miRNA, Nukleosomen, Extrazelluläre Vesikel, *Tumor-Educated Platelets*) eher dem Monitoring des Patienten (z. B. Therapieüberwachung, Rezidivkontrolle). Alle genannten Methoden sind weitere Bausteine im tieferen Verständnis von Tumorerkrankungen und werden möglicherweise in weiterer Zukunft noch relevante Ergebnisse liefern.

Die Verfahren der *Liquid biopsy* finden in der humanmedizinischen Onkologie Anwendung, beispielsweise zur Früherkennung von Krebs (nur bei bestimmten Tumorarten), zur Abschätzung des Metastasierungsrisikos, zur Identifizierung therapeutischer Zielstrukturen und Resistenzmechanismen sowie dem Tumor-Monitoring (Jia *et al.* 2021; Carr und Welch 2023). Der diagnostische Einsatz der *Liquid biopsy* wird bisher lediglich als ergänzendes Verfahren für streng definierte Tumorarten/Indikationen empfohlen (z. B. tief liegende Lungen-tumore, Gehirntumore, Zustand des Patienten). Gewebebasierte Untersuchungen sind diagnostisch stets überlegen, falls repräsentative Proben entnommen werden können (Jung und Kirchner 2018; Kruglyak *et al.* 2021). Grundsätzlich ist also stets abzuwägen, ob und inwieweit, ein Tumor nicht durch klinische oder bildgebende Diagnostik zu lokalisieren ist, und ob die Diagnose mittels Zytologie oder Histologie sowie ggf. durch weiterführende immunhistologische oder molekulargenetische Methoden gestellt werden kann. Die Methoden der *Liquid biopsy* sind in der Humanmedizin bislang nicht als diagnostische Screeningverfahren zugelassen (Batool *et al.* 2023). Internationale Konsortien, wie die *European Liquid Biopsy Society* (ELBS, www.elbs.eu) sind gegenwärtig bestrebt, diese neuen Methoden zu standardisieren, da eine Vielzahl von Faktoren (Probenentnahme, Aufarbeitung, Methodik, Medikamente, Tumorstadium, Ko-Morbiditäten) die Werte beeinflussen können (Batool *et al.* 2023; Chen *et al.* 2023).

Die besonderen Herausforderungen für

die Tiermedizin liegen in den technischen Adaptationen aus der Humanmedizin, den Speziesunterschieden, der Durchführung von gut definierten Studien sowie der Kostenproblematik (Chibuk *et al.* 2021).

Zirkulierende (epitheliale) Tumorzellen (CTCs, CETCs)

Zirkulierende (epitheliale) Tumorzellen (CTCs, CETCs) werden aus dem Blut isoliert und dienen der Diagnostik (falls eine Biopsie nicht möglich ist) sowie der Prognosestellung (Metastasierungsaktivität). Zudem können an ihnen Medikamente auf ihre Wirksamkeit getestet werden (Kasimir-Bauer 2018; Pascual *et al.* 2022). In der Literatur finden sich erste Studien zu zirkulierenden Tumorzellen bei Mammatumoren (Da Costa *et al.* 2013; Marconato *et al.* 2019) und Osteosarkomen (Wright *et al.* 2023) beim Hund.

Zellfreie zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA, cfDNA)

Die Analyse von zellfreier zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA, cfDNA) erlaubt die Identifizierung von Veränderungen im Tumorgenom während des Therapieverlaufs, beispielsweise im Hinblick auf die Entwicklung von Resistzenzen. Die Menge der verfügbaren ctDNA korreliert dabei mit dem Tumorstadium der Patienten. Aufgrund der geringen Menge dieser Marker im Blut, die weniger als 0,001 % im Plasma beträgt, war ein Nachweis zuvor nicht möglich. Erst durch die Etablierung neuer Verfahren und hochsensitiver Techniken, wie der „droplet digital PCR“ (ddPCR) oder dem „Next Generation Sequencing“ (NGS), wurde ein Nachweis überhaupt möglich (Jung und Kirchner 2018). In der Humanmedizin werden Untersuchungen von zirkulierenden (epithelialen) Tumorzellen und zellfreier Tumor-DNA (ctDNA) bei metastasierten Tumorerkrankungen angewendet also v. a. bei Karzinomen von Lunge, Mamma, Darm, Leber, Prostata und Ovar (Heidrich *et al.* 2021). Allerdings erfordern diese Verfahren für den routinemäßigen Einsatz ein hohes Maß an Standardisierung und Validierung, wenn sie für Screenings etabliert werden sollen (Lockwood *et al.* 2023). Die weiterführende Forschung

beschäftigt sich außerdem mit der Subklassifizierung der Fragmente der zellfreien Tumor-DNA, um daraus noch präzisere Aussagen ableiten zu können (Ding und Lo 2022).

Beim Hund wurden histiozytäre Sarkome, Lymphome und orale Melanome über den Nachweis der *PTPN11* Mutation in der zellfreien DNA im Plasma identifiziert (Prouteau *et al.* 2021). Ein Test aus den USA (OncoK9 von PetDx – seit März 2024 nicht mehr verfügbar) diagnostizierte anhand verschiedener typischer Mutationen in zellfreier DNA im Blutplasma insbesondere Lymphome, Osteosarkome, Hämangiosarkome, histiozytäre Sarkome, Mammakarzinome, maligne Melanome, Mastzelltumore, Weichteilsarkome und Analbeutelkarzinome beim Hund (Flory *et al.* 2022; O'Kell *et al.* 2023). Auch andere Firmen, wie z. B. Can-Can Diagnostics (Vereinigtes Königreich) bieten ctDNA basierte Screeningtests an. Des Weiteren gibt es auch eine Studie zur differenzialdiagnostischen Nutzung der ctDNA in verschiedenen Milzknoten des Hundes (Favaro *et al.* 2022), die aber noch nicht routinemäßig angeboten wird.

Tumor-Mutations-Last (TML, engl. TMB)

Die Tumor-Mutations-Last (TML, engl. TMB) kann allgemein als Gesamtzahl der in einer Tumorprobe vorhandenen Mutationen definiert werden. In der Humanmedizin ist sie v. a. für die Prognose und Therapie (Immuntherapie) von Bedeutung (Samstein *et al.* 2019; Riviere *et al.* 2020; Ballke *et al.* 2021; Smith *et al.* 2023). Die Quantifizierung der TML wird von mehreren Faktoren beeinflusst: 1) dem Anteil des Tumorgewebes in der Probe, 2) der Sequenzierung, 3) der Datenbank, mit der die Mutationen ermittelt werden, und 4) den Interpretationsmöglichkeiten der TML-Werte aus den bisher bekannten Daten. Die von der FDA festgelegten h-TML-Grenzwerte haben sich im Laufe der Jahre von 20 mut/Mb auf 16, 12 und jetzt 10 mut/Mb verschoben, und es bleibt fraglich, ob ein universeller Cut-off von 10 Mut/Mb für alle Tumorarten geeignet ist (Addeo *et al.* 2019). In der Tiermedizin gibt es eine Übersichtsarbeit zum TML-Status bei verschie-

denen Tumoren des Hundes, die zeigt, dass Mammatumore und Gliome eine geringere Tumormutationslast (Median < 0,5 Mutationen pro Mb) haben, während orale Melanome, Osteosarkome und Hämangiosarkome eine höhere TML aufweisen (Median ≥ 1 Mutation pro Mb) (Alsaihati *et al.* 2021). Inwieweit diese Analysen einen diagnostischen, prognostischen oder therapeutischen Nutzen beim Hund haben werden, bleibt abzuwarten.

Darüber hinaus wurde der *BRAF* p.V595E-Status zur Überwachung des Krankheitsverlaufs in zwei Studien untersucht: In der Plasma-DNA von insgesamt 16 Hunden mit urothelialen Karzinomen konnte ein Anstieg der Menge an *BRAF* p.V595E ctDNA mit dem Fortschreiten der Krankheit (Tumorwachstum, Metastasierung) festgestellt werden. Gleichzeitig konnte ein Abfall der ctDNA-Menge beobachtet werden, wenn sich der Tumor als Reaktion auf die Behandlung verkleinerte (Tagawa *et al.* 2020; Kim *et al.* 2022). Eine weitere Validierung mit größeren Patientenzahlen ist erforderlich, um die Eignung von *BRAF* p.V595E ctDNA als Progressionsmarker bei Hunden zu bestimmen.

Nukleosomen

Nukleosomen stellen essentielle Bestandteile im Zellkern von Eukaryoten dar, wo sie für die Verpackung und Komprimierung der DNA im Zellkern zuständig sind. Ein Nukleosom bezeichnet die Einheit von DNA und einem Histon-Oktamer. Das Oktamer setzt sich aus je zwei Exemplaren der Proteine H2A, H2B, H3 und H4 zusammen.

In der Tiermedizin wird aktuell ein allgemeiner Screening-Test für Tumore beim Hund angeboten, der auf dem Nachweis einer erhöhten Konzentration von Nukleosomen im Blut beruht (Nu.Q® Vet Cancer Test). Dabei wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse bislang nur für klinisch gesunde Hunde aussagefähig sind (Wilson-Robles *et al.* 2020; Wilson-Robles *et al.* 2022). Der Grund ist, dass entzündlich, traumatisch (oder anderweitig) erhöhte Nukleosomenmengen im Blut nicht von tumorbedingten erhöhten Nukleosomenkonzentrationen unterschieden werden können (Letendre

und Goggs 2018a, 2018b; Martiny und Goggs 2019; Krogh *et al.* 2021). Gemäß der Herstellerangaben ist dieser Test insbesondere für die Detektion von Lymphomen (Dolan *et al.* 2021; Wilson-Robles *et al.* 2023) und Hämangiosarkomen (Wilson-Robles *et al.* 2021) geeignet, die mit anderen klinischen Methoden (z. B. Bildgebung) nicht erfasst oder differenziert werden können. Auch andere Tumore können mit erhöhten Nukleosomenkonzentrationen einhergehen (Wilson-Robles *et al.* 2022), von denen viele aber auch durch Adspektion, Palpation und Zytologie zu diagnostizieren sind (z. B. Mastzelltumore, Melanome). Die Forschung auf diesem Gebiet ist noch nicht abgeschlossen und die weitere Entwicklung, beispielsweise im Hinblick auf den Nutzen im Monitoring der Tumorerkrankung, bleibt abzuwarten.

MikroRNAs (syn. miRNAs)

MikroRNAs (syn. miRNAs) sind nicht zu verwechseln mit der messenger RNA (mRNA). miRNAs sind kleine nicht-kodierende RNAs, die die Expression von Genen durch Unterdrückung oder Verstärkung der Translation regulieren und an der Zellentwicklung und Apoptose bei gesunden Zellen beteiligt sind (Bartel 2004). Außerdem scheinen miRNAs tumorsuppressive oder onkogene Effekte zu haben. Obwohl miRNAs als potenzielles Diagnoseinstrument für die Krebserkennung angesehen werden, ist ihre Anwendung in der klinischen Routine der Humanmedizin noch in den Anfängen (Sohel 2020; Wang *et al.* 2021). In der Veterinärmedizin gibt es bereits zahlreiche Studien zu miRNAs bei verschiedenen Erkrankungen (Übersicht in: Kehl *et al.* 2024) Allerdings sind bislang keine auf miRNAs basierenden Tests auf dem Markt verfügbar, die sich für den routinemäßigen Einsatz eignen.

Extrazelluläre Vesikel (EV)

Bei den Extrazellulären Vesikeln (EV) werden 1) Exosomen, 2) Mikrovesikel und 3) apoptotische Vesikel unterschieden (El Magraoui *et al.* 2017). Extrazelluläre Vesikel werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin hauptsäch-

lich bei Tumorerkrankungen, aber auch in der Kardiologie, Nephrologie, Reproduktionsmedizin, Parasitologie und Regenerativen Medizin erforscht (Diomaiuto *et al.* 2021). Zu den extrazellulären Vesikeln in Verbindung mit miRNA Konzentrationen gibt es eine erste Arbeit an 19 Hunden mit Lymphomen, die den Therapieverlauf (CHOP-Protokoll) dokumentieren konnte (Garnica *et al.* 2020).

Molekulare Marker in Thrombozyten

Molekulare Marker in Thrombozyten (*Tumor-Educated Platelets*) können im Blut detektiert werden und der Tumordiagnose dienen (Zhang *et al.* 2023). Die Thrombozyten helfen bei der Blutstillung, übernehmen immunologische Aufgaben, unterstützen den Gefäßumbau und fördern Entzündungen. Sie spielen daher auch eine aktive Rolle in der Tumorbioologie und werden ihrerseits dynamisch von Tumorzellen beeinflusst („erzogen“- „educated“). Diese Thrombozyten-Tumorzell-Interaktionen führen zu einem veränderten RNA-Profil der Thrombozyten (Varkey und Nicolaides 2021). Es gibt erste Studien zur Thrombozyten-basierten Tumordiagnostik beim Menschen (Veld *et al.* 2022), aber auch in der Humanmedizin steht diese Entwicklung noch am Anfang, denn Antikoagulantien, Krebstherapien, Entzündungen und andere Erkrankungen müssen in die komplexe Interpretation einbezogen werden (Antunes-Ferreira *et al.* 2021). Für Hund und Katze gibt es bislang noch keine diesbezüglichen Publikationen.

Zusammenfassung

Die *KIT*-Mutationsanalyse, vor allem des Exons 11, kann bei kaninen kutanen Mastzelltumoren relevante prognostische und therapeutische Informationen liefern. Bei Katzen spielen andere Mutationen in den Mastzelltumoren eine Rolle, deren prognostische und therapeutische Relevanz jedoch nicht gesichert ist.

Der Nachweis der *BRAF*-Mutation erweist sich bei Urothel- und Prostatakarzinomen des Hundes als diagnostisch und therapeutisch wertvoll. Diese Diagnostik kann für

urothiale Karzinome durch die Analyse von Copy-Number-Alterationen ergänzt werden. Die *BRAF*-Mutation spielt bei urothelialen Karzinomen der Katze in Diagnose oder Therapie leider keine Rolle. Die Klonalitätsuntersuchung (PARR) kann bei der Charakterisierung lymphozytärer Proliferationen hilfreich sein und die Ergebnisse können auf Prognose und Therapie Einfluss haben, wenn sie zur Subklassifizierung von Lymphomen beitragen. Diese Methode funktioniert bei Proben vom Hund zuverlässiger als bei denen der Katze.

Darüber hinaus stehen seit kurzem auch Multi-Gen-Mutationspanel zur Verfügung, die eine komplexe molekulargenetische Charakterisierung von Tumoren des Hundes liefern. Dadurch wird die Möglichkeit eröffnet, individuelle Behandlungen mit gezielt mutationsspezifischen Medikamenten durchzuführen. Diese neuen therapeutischen Optionen sind noch nicht umfassend klinisch validiert und zugelassen und müssen daher von erfahrenen Onkologinnen und Onkologen im Einzelfall geprüft und begleitet werden.

Die Verfahren, die auf der Diagnostik anhand von Körperflüssigkeiten beruhen (*Liquid biopsy*), basieren auf der Detektion von Tumorzellen und ihrer DNA oder auf epigenetischen Markern (z. B. Nukleosomen, miRNA u. a.). Ihre Validierung muss noch intensiviert, und die Möglichkeiten sowie Limitierungen müssen präzise evaluiert werden.

Fazit für die Praxis

Es lässt sich insgesamt feststellen, dass auch in der Tiermedizin die molekulargenetische Diagnostik zunehmend in die Routinediagnostik integriert wird. Daher sind eine enge interdisziplinäre Kooperation und Kommunikation zwischen Klinik, Pathologie und Molekulargenetik erforderlich, um sich mit den Möglichkeiten und Grenzen der neuen Methoden vertraut zu machen. Die molekulargenetischen Einzelanalysen (*KIT*, *BRAF*, PARR) sind in der Veterinärmedizin bereits seit einigen Jahren in der Routinediagnostik etabliert.

Im Vergleich zur Humanmedizin besteht jedoch noch ein hoher Forschungsbedarf, um neue relevante diagnostische, prognostische und therapeutische Biomarker für Hund und Katze zu entwickeln. In diesem Kontext sind die Multi-Gen-Mutationsassays sowie die epigenetisch basierten Verfahren von Bedeutung, die unter dem Begriff der *Liquid Biopsy* (z. B. Nukleosomen, miRNA u. a.) zusammengefasst werden.



Literatur

- AACR Project GENIE Consortium (2017) AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov* 7, 818–831.
- Abadie, J. *et al.* (2009) Epidemiology, pathology, and genetics of histiocytic sarcoma in the Bernese mountain dog breed. *J Hered* 100 Suppl 1, S19–27.
- Addae, A. *et al.* (2019) Tumor Mutation Burden-From Hopes to Doubts. *JAMA Oncol* 5, 934–935.
- Aeschlimann, L. *et al.* (2024) Effective detection of BRAF V595E mutation in canine urothelial and prostate carcinomas using immunohistochemistry. *Vet Comp Oncol* 22, 295–302.
- Aleksakhina, S.N. und Imyanitov, E.N. (2021) Cancer Therapy Guided by Mutation Tests: Current Status and Perspectives. *Int J Mol Sci* 22, 10931.
- Alsaihati, B.A. *et al.* (2021) Canine tumor mutational burden is correlated with TP53 mutation across tumor types and breeds. *Nat Commun* 12, 4670.
- Antunes-Ferreira, M. *et al.* (2021) Circulating platelets as liquid biopsy sources for cancer detection. *Mol Oncol* 15, 1727–1743.
- Arendt, M.L. *et al.* (2015) Genome-Wide Association Study of Golden Retrievers Identifies Germ-Line Risk Factors Predisposing to Mast Cell Tumours. *PLoS Genet* 11, e1005647.
- Aupperle-Lellbach, H. *et al.* (2018) Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Bioptaten beim kaninen Übergangszellkarzinom. *Tierarztl Prax Augs K Kleintiere Heimtiere* 46, 289–295.
- Aupperle-Lellbach, H. *et al.* (2019) Die BRAF-Mutation V595E im Übergangszellkarzinom – Untersuchungen zur Rassedisposition bei Terriern. *Kleintiermedizin*, 30–33.
- Aupperle-Lellbach, H. *et al.* (2023) KITLG Copy Number Germline Variations in Schnauzer Breeds and Their Relevance in Digital Squamous Cell Carcinoma in Black Giant Schnauzers. *Vet Sci* 10, 147.
- Aupperle-Lellbach, H. *et al.* (2024) Clinical Use of Molecular Biomarkers in Canine and Feline Oncology: Current and Future. *Vet Sci* 11, 199.
- Ballke, S. *et al.* (2021) Correlation of in vivo imaging to morphomolecular pathology in translational research: challenge accepted. *EJNMMI Res* 11, 83.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.
- Batool, S.M. *et al.* (2023) The Liquid Biopsy Consortium: Challenges and opportunities for early cancer detection and monitoring. *Cell Rep Med* 4, 101198.
- Bellamy, E. und Berlatto, D. (2022) Canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours: a narrative review. *J Small Anim Pract* 63, 497–511.
- Berger, E.P. *et al.* (2018) Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) use in cats with mast cell neoplasia. *J Feline Med Surg* 20, 95–102.
- Bonkobara, M. (2015) Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. *Vet J* 205, 180–188.
- Bowlt Blacklock, K.L. *et al.* (2019) Genome-wide analysis of canine oral malignant melanoma metastasis-associated gene expression. *Sci Rep* 9, 6511.
- Brocca, G. *et al.* (2020) KIT Somatic Mutations and Immunohistochemical Expression in Canine Oral Melanoma. *Animals* 10, 2370.
- Brocks, B.A.W. *et al.* (2021) Internal Tandem Duplication of

- Exon 8 of c-kit Is Associated With Longer Total Survival in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol* 58, 315–324.
- Burkhart, M.J. und Bienzle, D. (2013) Making sense of lymphoma diagnostics in small animal patients. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 43, 1331–47, vii.
- Burnett, R.C. et al. (2003) Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol* 40, 32–41.
- Burton, J.H. et al. (2015) Pulse-Administered Toceranib Phosphate Plus Lomustine for Treatment of Unresectable Mast Cell Tumors in Dogs. *J Vet Intern Med* 29, 1098–1104.
- Carr, D.J. und Welch, H.G. (2023) Assessing the Clinical Utility of Liquid Biopsies Across 5 Potential Indications From Therapy Selection to Population Screening: A Review. *JAMA Intern Med* 183, 1144–1151.
- Chambers, J.K. et al. (2023) Diagnostic challenge in veterinary pathology: Detection of BRAF(V595E) mutation in a dog with follicular cystitis and flat urothelial lesion with atypia. *Vet Pathol* 61, 335–338.
- Chen, P. et al. (2022) Mutations in Exons 8 and 11 of c-kit Gene in Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors and Their Association with Cell Proliferation. *Vet Sci* 9, 493.
- Chen, Z. et al. (2023) Liquid biopsies for cancer: From bench to clinic. *MedComm* (2020) 4, e329.
- Cheng, L.Y. et al. (2021) High sensitivity sanger sequencing detection of BRAF mutations in metastatic melanoma FFPE tissue specimens. *Sci Rep* 11, 9043.
- Chibuk, J. et al. (2021) Horizons in Veterinary Precision Oncology: Fundamentals of Cancer Genomics and Applications of Liquid Biopsy for the Detection, Characterization, and Management of Cancer in Dogs. *Front Vet Sci* 8, 664718.
- Chon, E. et al. (2023a) Novel genomic prognostic biomarkers for dogs with cancer. *J Vet Intern Med* 37, 2410–2421.
- Chon, E. et al. (2023b) Genomic tumor analysis provides clinical guidance for the management of diagnostically challenging cancers in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 261, 668–677.
- Cronise, K.E. et al. (2022) Characterizing the molecular and immune landscape of canine bladder cancer. *Vet Comp Oncol* 20, 69–81.
- Da Costa, A. et al. (2013) Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. *Vet J* 196, 34–39.
- Decker, B. et al. (2015) Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer—Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol Cancer Res* 13, 993–1002.
- Di Palma, S. et al. (2021) Review on Canine Oral Melanoma: An Undervalued Authentic Genetic Model of Human Oral Melanoma? *Vet Pathol* 58, 881–889.
- Ding, S.C. und Lo, Y.M.D. (2022) Cell-Free DNA Fragmentomics in Liquid Biopsy. *Diagnóstics* 12, 978.
- Diomaioli, E. et al. (2021) Exosomes in Dogs and Cats: An Innovative Approach to Neoplastic and Non-Neoplastic Diseases. *Pharmaceuticals* 14, 766.
- Dolan, C. et al. (2021) Characterizing circulating nucleosomes in the plasma of dogs with lymphoma. *BMC Vet Res* 17, 276.
- El Magraoui, F. et al. (2017) Zirkulierende extrazelluläre Vesikel – die Biomarker der Zukunft?! *Biospektrum* 23, 777–778.
- Favarro, P.F. et al. (2022) Feasibility of circulating tumor DNA analysis in dogs with naturally occurring malignant and benign splenic lesions. *Sci Rep* 12, 6337.
- Flory, A. et al. (2022) Clinical validation of a next-generation sequencing-based multi-cancer early detection “liquid biopsy” blood test in over 1,000 dogs using an independent testing set: The CANcer Detection in Dogs (CANDiD) study. *PLoS One* 17, e0266623.
- Foskett, A. et al. (2017) Tolerability of oral sorafenib in pet dogs with a diagnosis of cancer. *Vet Med (Auckl)* 8, 97–102.
- Freytag, J.O. et al. (2021) Prognostic value of immunohistochemical markers in canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis. *Vet Comp Oncol* 19, 529–540.
- Frost, D. et al. (2003) Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Vet Pathol* 40, 42–54.
- Garnica, T.K. et al. (2020) Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. *Sci Rep* 10, 20371.
- Gedon, J. et al. (2022) BRAF mutation status and its prognostic significance in 79 canine urothelial carcinomas: A retrospective study (2006–2019). *Vet Comp Oncol* 20, 449–457.
- Gentilini, F. et al. (2009) GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol* 127, 47–56.
- Gerstung, M. et al. (2020) The evolutionary history of 2,658 cancers. *Nature* 578, 122–128.
- Giuliano, A. (2021) Companion Animal Model in Translational Oncology; Feline Oral Squamous Cell Carcinoma and Canine Oral Melanoma. *Biology* 11, 54.
- Grassinger, J.M. et al. (2019a) Nachweis der BRAF-Mutation bei kaninchen Prostataerkrankungen. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 47, 313–320.
- Grassinger, J.M. et al. (2019b) Correlation of BRAF Variant V595E, Breed, Histological Grade and Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Transitional Cell Carcinomas. *Vet Sci* 6.
- Gregory-Bryson, E. et al. (2010) Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11. *BMC cancer* 10, 559.
- Gress, V. et al. (2016) Characterization of the T-cell receptor gamma chain gene rearrangements as an adjunct tool in the diagnosis of T-cell lymphomas in the gastrointestinal tract of cats. *Res Vet Sci* 107, 261–266.
- Hahn, K.A. et al. (2008) Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 22, 1301–1309.
- Hammer, S.E. et al. (2017) Characterization of a PCR-based lymphocyte clonality assay as a complementary tool for the diagnosis of feline lymphoma. *Vet Comp Oncol* 15, 1354–1369.
- Hardwick, L. (2021) A Comparative View on Molecular Alterations and Potential Therapeutic Strategies for Canine Oral Melanoma. *Vet Sci* 8, 286.
- Hédan, B. et al. (2021) Identification of common predisposing loci to hematopoietic cancers in four dog breeds. *PLoS Genet* 17, e1009395.
- Heidrich, I. et al. (2021) Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer* 148, 528–545.
- Irelli, A. et al. (2023) Role of the Molecular Tumor Board for the Personalized Treatment of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Focus on the State of the Art in Italy. *Cancers* 15, 1727.
- Jia, S. et al. (2021) Values of liquid biopsy in early detection of cancer: results from meta-analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 21, 417–427.
- Jung, A. und Kirchner, T. (2018) Liquid Biopsy in Tumor Genetic Diagnosis. *Dtsch Arztebl Int* 115, 169–174.
- Jung, H. et al. (2021) Establishment of Canine Transitional Cell Carcinoma Cell Lines Harboring BRAF V595E Mutation as a Therapeutic Target. *Int J Mol Sci* 22.
- Karyadi, D.M. et al. (2013) A copy number variant at the KITLG locus likely confers risk for canine squamous cell carcinoma of the digit. *PLoS Genet* 9, e1003409.
- Kasimir-Bauer, S. (2018) Zirkulierende Tumorzellen und was sie beinhalten: Zirkulierende Tumorzellen und was sie beinhalten: Sind „Liquid Biopsies“ die Zukunft? *Gynäkologische Praxis* 44, 75–84.
- Kehl, A. et al. (2024) Review of Molecular Technologies for Investigating Canine Cancer. *Animals* 14, 769.
- Keller, S.M. und Moore, P.F. (2012) A novel clonality assay for the assessment of canine T cell proliferations. *Vet Immunol Immunopathol* 145, 410–419.
- Keller, S.M. et al. (2016) Clonality Testing in Veterinary Medicine: A Review With Diagnostic Guidelines. *Vet Pathol* 53, 711–725.
- Kim, J.-H. et al. (2021a) Longitudinal assessment of B-RAF V595E levels in the peripheral cell-free tumor DNA of a 10-year-old spayed female Korean Jindo dog with unresectable metastatic urethral transitional cell carcinoma for monitoring the treatment response to a RAF inhibitor (sorafenib). *Vet Q* 41, 153–162.
- Kim, R.H. et al. (2022) Deep Learning and Pathomics Analyses Reveal Cell Nuclei as Important Features for Mutation Prediction of BRAF-Mutated Melanomas. *J Invest Dermatol* 142, 1650–1658.e6.
- Kim, W.S. et al. (2021b) Comparative Review of Malignant Melanoma and Histologically Well-Differentiated Melanocytic Neoplasm in the Oral Cavity of Dogs. *Vet Sci* 8, 261.
- Kiupel, M. et al. (2011) Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol* 48, 147–155.
- Kobayashi, M. et al. (2012) Canine intestinal mast cell tumor with c-kit exon 8 mutation responsive to imatinib therapy. *Vet J* 193, 264–267.
- Krogh, A.K.H. et al. (2021) Presence of nucleosomes in plasma and increased thrombin generation in dogs with acute and chronic gastroenteropathies. *Res Vet Sci* 135, 504–510.
- Kruglyak, K.M. et al. (2021) Blood-Based Liquid Biopsy for Comprehensive Cancer Genomic Profiling Using Next-Generation Sequencing: An Emerging Paradigm for Non-invasive Cancer Detection and Management in Dogs. *Front Vet Sci* 8, 704835.
- Küchler, L. et al. (2023) Artificial Intelligence to Predict the BRAF V595E Mutation in Canine Urinary Bladder Urothelial Carcinomas. *Animals* 13, 2404.
- Langerak, A.W. et al. (2012) EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 26, 2159–2171.
- Letendre, J.-A. und Goggs, R. (2018a) Concentrations of Plasma Nucleosomes but Not Cell-Free DNA Are Prognostic in Dogs Following Trauma. *Front Vet Sci* 5, 180.
- Letendre, J.-A. und Goggs, R. (2018b) Determining prognosis in canine sepsis by bedside measurement of cell-free DNA and nucleosomes. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 28, 503–511.
- Linggaas, F. et al. (2003) A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. *Hum Mol Genet* 12, 3043–3053.
- Lockwood, C.M. et al. (2023) Recommendations for Cell-Free DNA Assay Validations: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 25, 876–897.
- London, C.A. (2009) Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top Companion Anim Med* 24, 106–112.
- London, C.A. (2014) Small molecule inhibitors in veterinary oncology practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 44, 893–908.
- London, C.A. und Seguin, B. (2003) Mast cell tumors in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33, 473–489.
- Malone, E.R. et al. (2020) Molecular profiling for precision cancer therapies. *Genome medicine* 12, 8.
- Marconato, L. et al. (2019) Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study. *Cancers* 11.
- Martinez-Jiménez, F. et al. (2020) A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat Rev Cancer* 20, 555–572.
- Martiny, P. und Goggs, R. (2019) Biomarker Guided Diagnosis of Septic Peritonitis in Dogs. *Front Vet Sci* 6, 208.
- Melendez-Lazo, A. et al. (2019) Clonality testing in the lymph nodes from dogs with lymphadenomegaly due to *Leishmania infantum* infection. *PLoS One* 14, e0226336.
- Mochizuki, H. und Breen, M. (2015) Comparative Aspects of BRAF Mutations in Canine Cancers. *Vet Sci* 2, 231–245.
- Mochizuki, H. et al. (2015a) BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS One* 10, e0129534.
- Mochizuki, H. et al. (2015b) Detection of BRAF Mutation in Urine DNA as a Molecular Diagnostic for Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma. *PLOS One* 10, e0144170.
- Mochizuki, H. et al. (2016) Detection of Copy Number Imbalance in Canine Urothelial Carcinoma with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. *Vet Pathol* 53, 764–772.
- Mochizuki, H. et al. (2017) Genomic profiling of canine mast cell tumors identifies DNA copy number aberrations associated with KIT mutations and high histological grade. *Chromosome Res* 25, 129–143.
- Moe, L. und Liim, B. (1997) Hereditary multifocal renal cystadenocarcinomas and nodular dermatofibrosis in 51 German shepherd dogs. *J Small Anim Pract* 38, 498–505.
- Morini, M. et al. (2022) Mutational Analysis of c-KIT and PDGFRA in Canine Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs). *Vet Sci* 9, 376.
- Mutsaers, A.J. et al. (2003) Canine Transitional Cell Carcinoma. *J Vet Int Med* 17, 136.
- Nardi, A.B. de et al. (2022) Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells* 11, 618.
- O’Kell, A.L. et al. (2023) Clinical experience with next-generation sequencing-based liquid biopsy testing for cancer detection in dogs: a review of 1,500 consecutive

- clinical cases. *J Am Vet Med Assoc* 261, 827–836.
- Pantke, P. et al. (2019) Erste klinische Erhebungen zur Überlebensrate von Hunden mit Übergangszellkarzinom und BRAF-Mutation V595E. *Kleintierpraxis* 64, 680–686.
- Parker, H.G. et al. (2024) Genome-wide analyses reveals an association between invasive urothelial carcinoma in the Shetland sheepdog and NIPAL1. *NPJ Precis Oncol* 8, 112.
- Pascual, J. et al. (2022) ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* 33, 750–768.
- Patnaik, A.K. et al. (1984) Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 21, 469–474.
- Pazzi, P. et al. (2022) Treatment of Canine Oral Melanomas: A Critical Review of the Literature. *Vet Sci* 9, 196.
- Poulikakos, P.I. et al. (2022) Molecular Pathways and Mechanisms of BRAF in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 28, 4618–4628.
- Prouteau, A. et al. (2021) Circulating tumor DNA is detectable in canine histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma, and multicentric lymphoma. *Sci Rep* 11, 877.
- Rigau, M. et al. (2019) Intrinsic CNVs and gene expression variation in human populations. *PLoS Genet* 15, e1007902.
- Riviere, P. et al. (2020) High Tumor Mutational Burden Correlates with Longer Survival in Immunotherapy-Naïve Patients with Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther* 19, 2139–2145.
- Rodney, A.R. et al. (2023) Genomic landscape and gene expression profiles of feline oral squamous cell carcinoma. *Front Vet Sci* 10, 1079019.
- Rodrigues, L. et al. (2023) Shared hotspot mutations in oncogenes position dogs as an unparalleled comparative model for precision therapeutics. *Sci Rep* 13, 10935.
- Rossman, P. et al. (2021) Phase I/II Trial of Vemurafenib in Dogs with Naturally Occurring, BRAF-mutated Urothelial Carcinoma. *Mol Cancer Ther* 20, 2177–2188.
- Sabattini, S. et al. (2018) Canine Splenic Nodular Lymphoid Lesions: Immunophenotyping, Proliferative Activity, and Clonality Assessment. *Vet Pathol* 55, 645–653.
- Sakthikumar, S. et al. (2023) Standing in the canine precision medicine knowledge gap: Improving annotation of canine cancer genomic biomarkers through systematic comparative analysis of human cancer mutations in COSMIC. *Vet Comp Oncol* 21, 482–491.
- Samstein, R.M. et al. (2019) Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature Genet* 51, 202–206.
- Shapiro, S.G. et al. (2015) Canine urothelial carcinoma: genetically aberrant and comparatively relevant. *Chromosome Res* 23, 311–331.
- Shearin, A.L. et al. (2012) The MTAP-CDKN2A locus confers susceptibility to a naturally occurring canine cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21, 1019–1027.
- Smedley, R.C. et al. (2021) Correlation Between KIT Expression and c-Kit Mutations in 2 Subtypes of Canine Oral Melanocytic Neoplasms. *Vet Pathol* 58, 683–691.
- Smith, J.R. et al. (2023) Mutation Burden Independently Predicts Survival in the Pan-Cancer Atlas. *JCO Precis Oncol* 7, e2200571.
- Sobottka, B. und Weber, A. (2020) Molekulare Tumordiagnostik – aktuelle Methoden, Anwendungsbeispiele und Ausblick. *Pathologe* 41, 411–424.
- Sohel, M.M.H. (2020) Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis. *Life Sci* 248, 117473.
- Sokolenko, A.P. und Imyanitov, E.N. (2018) Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Front Mol Biosci* 5, 76.
- Tagawa, M. et al. (2019) Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors. *J Vet Diagn Invest* 31, 836–843.
- Tagawa, M. et al. (2020) Quantitative analysis of the BRAF V595E mutation in plasma cell-free DNA from dogs with urothelial carcinoma. *PLoS One* 15, e0232365.
- Takeuchi, Y. et al. (2013) Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast tumours: a retrospective cohort study. *Vet J* 196, 492–498.
- Tamborero, D. et al. (2022) The Molecular Tumor Board Portal supports clinical decisions and automated reporting for precision oncology. *Nat Cancer* 3, 251–261.
- Tamlin, V.S. et al. (2020) Comparative aspects of mast cell neoplasia in animals and the role of KIT in prognosis and treatment. *Vet Med Sci* 6, 3–18.
- Thamm, D.H. et al. (2019) Prognostic and predictive significance of KIT protein expression and c-kit gene mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Vet Comp Oncol* 17, 451–455.
- Thamm, D.H. et al. (2020) Phosphorylated KIT as a predictor of outcome in canine mast cell tumours treated with toceranib phosphate or vinblastine. *Vet Comp Oncol* 18, 169–175.
- Törner, K. et al. (2024) What can we learn from five years of BRAF mutation analysis in routine diagnostics? *ESVONC Annual Congress Proceedings*, Bucharest, Romania, 22–26.05.2024, p.131.
- van der Weyden, L. et al. (2016) Cross-species models of human melanoma. *J Pathol* 238, 152–165.
- van der Weyden, L. et al. (2020) Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma. *J Pathol* 252, 4–21.
- van Dongen, J.J. et al. (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17, 2257–2317.
- Varkey, J. und Nicolaides, T. (2021) Tumor-Educated Platelets: A Review of Current and Potential Applications in Solid Tumors. *Cureus* 13, e19189.
- Vaz-Drago, R. et al. (2017) Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* 136, 1093–1111.
- Veld, S.G.J.G. (2022) Detection and localization of early- and late-stage cancers using platelet RNA. *Cancer Cell* 40, 999–1009.e6.
- Vernau, W. und Moore, P.F. (1999) An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 69, 145–164.
- Vozdova, M. et al. (2020) Mutation and methylation status of KIT and TP53 in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 18, 438–444.
- Wan, P.T. et al. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855–867.
- Wang, L. et al. (2021) Diagnostic and Prognostic Role of miR-192 in Different Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2021, 8851035.
- Webster, J.D. et al. (2006) The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 8, 104–111.
- Wei, B.-R. et al. (2020) Efficacy, Tolerability, and Pharmacokinetics of Combined Targeted MEK and Dual mTORC1/2 Inhibition in a Preclinical Model of Mucosal Melanoma. *Mol Cancer Ther* 19, 2308–2318.
- Wiley, C. et al. (2019) Novel Noninvasive Diagnostics. *Vet Clin North Small Anim Pract* 49,781-791.
- Wilson-Robles, H. et al. (2020) Evaluation of nucleosome concentrations in healthy dogs and dogs with cancer. *PLoS One* 15, e0236228.
- Wilson-Robles, H. et al. (2021) Characterizing circulating nucleosomes in the plasma of dogs with hemangiosarcoma. *BMC Vet Res* 17, 231.
- Wilson-Robles, H.M. et al. (2022) Evaluation of plasma nucleosome concentrations in dogs with a variety of common cancers and in healthy dogs. *BMC Vet Res* 18, 329.
- Wilson-Robles, H. et al. (2023) Monitoring plasma nucleosome concentrations to measure disease response and progression in dogs with hematopoietic malignancies. *PLoS One* 18, e0281796.
- Wong, K. et al. (2019) Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nat Commun* 10, 353.
- Wong, K. et al. (2021) Comparison of the oncogenomic landscape of canine and feline hemangiosarcoma shows novel parallels with human angiosarcoma. *Dis Model Mech* 14, dmm049044.
- Wong, K. et al. (2023) Cross-species oncogenomics offers insight into human muscle-invasive bladder cancer. *Genome Biol* 24, 191.
- Wright, T.F. et al. (2023) Quantification of circulating tumour cells over time in dogs with appendicular osteosarcoma. *Vet Comp Oncol* 21, 541–550.
- Wu, K. et al. (2023) Analyses of canine cancer mutations and treatment outcomes using real-world clinico-genomics data of 2119 dogs. *NPJ Precis Oncol* 7, 8.
- Yu, Y. et al. (2021) Deleterious Mutations in the TPO Gene Associated with Familial Thyroid Follicular Cell Carcinoma in Dutch German Longhaired Pointers. *Genes* 12.
- Yu, Y. et al. (2022) Familial follicular cell thyroid carcinomas in a large number of Dutch German longhaired pointers. *Vet Comp Oncol* 20, 227–234.
- Žagar, Ž. und Schmidt, J.M. (2023) A Scoping Review on Tyrosine Kinase Inhibitors in Cats: Current Evidence and Future Directions. *Animals* 13, 3059.
- Zehir, A. et al. (2017) Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 23, 703–713.
- Zhang, Q. et al. (2023) Contents in tumor-educated platelets as the novel biosource for cancer diagnostics. *Front Oncol* 13, 1165600.

Korrespondenzadresse



**PD Dr. med. vet.
Heike Aupperle-Lellbach**

Laboklin GmbH & Co KG
Steubenstr. 4, 97688 Bad Kissingen
Tel. 0971-7202-0
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, TU München,
Trögerstr. 18, 81675 München
aupperle@laboklin.de

Studium an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Promotion und Habilitation am Institut für Veterinär-Pathologie an der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig
Fachtierärztin für Pathologie und Fachtierärztin für Bienen seit 2010 Privat-Dozentin an der Vet.Med. Fakultät Leipzig seit 2010 Diagnostik und Forschung bei Laboklin, Bad Kissingen seit 2023 Gastwissenschaftlerin am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Abt. Vergleichende experimentelle Pathologie, Technische Universität München Schwerpunkte: Tumorpathologie, kardiovaskuläre Erkrankungen, Organpathologie