

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Johannes Hirschberger

**Einzelnukleotidpolymorphismen im p53-Gen
als prädisponierender Faktor beim feline
Injektionsstellen-assoziierten Sarkom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Daniela Susanne Mucha

aus Nürnberg

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent/en: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
I EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
II LITERATURÜBERSICHT.....	3
1. DAS FELINE INJEKTIONSSTELLEN-ASSOZIIERTE SARKOM	3
1.1 Einteilung.....	4
1.2 Historie des FISS.....	4
1.3 Ätiopathogenese	5
1.3.1 Chronisch-granulomatöse Entzündung.....	6
1.3.2 Genetische Prädisposition	7
1.3.2.1 Numerische und strukturelle Chromosomenveränderungen.....	9
1.3.2.2 Genmutationen.....	10
1.3.2.3 Einzelnukleotidpolymorphismen	12
2. DAS TUMORSUPPRESSORPROTEIN P53.....	14
2.1 Struktur.....	14
2.2 Funktion.....	16
2.3 Verankerung von p53 im Genom.....	17
3. MUTATIONEN IM P53-GEN ALS BESTANDTEIL DER TUMORENTSTEHUNG.....	18
3.1 Humanmedizin	19
3.2 Tiermedizin	20
III PUBLIKATION	22
1. ABSTRACT	23
2. INTRODUCTION.....	24
3. MATERIALS AND METHODS	26
4. RESULTS.....	28
5. DISCUSSION.....	29
6. SOURCE OF FUNDING.....	32
7. CONFLICT OF INTEREST.....	32
8. ACKNOWLEDGEMENTS.....	33
9. REFERENCES	33
10. FIGURE LEGENDS.....	39
11. TABLES	40
12. FIGURES.....	41
13. LETTER OF ACCEPTANCE	43
IV DISKUSSION	44

V	ZUSAMMENFASSUNG	49
VI	SUMMARY	50
VII	LITERATURVERZEICHNIS.....	51
VIII	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	65
IX	DANKSAGUNG	66

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DNA	Deoxyribonucleic acid
FeLV	Felines Leukämievirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FGF-a	Acidic fibroblast growth factor
FGF-b	Basic fibroblast growth factor
FISS	Feline injection-site sarcoma
FSA	Fibrosarkom
GWAS	Genome-wide association study
IL-1	Interleukin 1
IL-8	Interleukin 8
LOH	Loss of heterozygosity
MFH	Malignes fibröses Histiozytom
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
SNP	Single nucleotide polymorphism
TGF- α	Transforming growth factor- α
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
VEGF	Vascular endothelial growth factor

I Einleitung und Zielsetzung

Das Feline Fibrosarkom oder feline Injektionsstellen-assoziierte Sarkom (engl. feline injection-site sarcoma, FISS) stellt mit 40 % den häufigsten Hauttumor bei Katzen dar.

Aufgrund seines aggressiven biologischen Verhaltens und seines lokal invasiven Wachstums ist die vollständige chirurgische Entfernung als Standardtherapie häufig nicht erfolgreich und bei erstmaliger Exzision eines Primärtumors mit Rezidivraten von bis zu 70 % behaftet. Damit ist die Entstehung dieses mesenchymalen Bindegewebstumors eine gefürchtete iatrogene Komplikation von Impfungen und anderen subkutanen Injektionen bei Katzen, deren Therapie für Tierärzte noch immer eine große Herausforderung darstellt. Die Ätiologie ist bis heute nicht vollständig geklärt, doch wird ein Zusammenspiel von mehreren Faktoren favorisiert: Zum Einen das Vorhandensein einer chronisch-granulomatösen Entzündung im Unterhaut- oder Muskelgewebe, hervorgerufen durch langsam resorbierbare Substanzen wie Impfungen, aber auch Depot-Präparate oder Fremdkörper. Zum Anderen scheint für bestimmte Katzen eine individuelle Disposition vorzuliegen, da einige Katzen trotz vielfacher subkutaner Injektionen lebenslang frei von dieser Erkrankung bleiben, und andere Katzen eine Prädisposition für diese Krankheit zu haben scheinen. Letztgenannte weisen FISS im Laufe von Jahren an verschiedenen Injektionsstellen auf. Weiterhin sprechen das gehäufte Auftreten von FISS bei miteinander verwandten Tieren sowie das geringere Alter betroffener Katzen für eine genetische Komponente in der Ätiologie dieser Erkrankung. Das Tumorsuppressorprotein p53, auch „der Wächter des Genoms“ genannt, ist das bekannteste Protein mit protektiver Rolle für die genetische Integrität im Zellzyklus. Da bei vielen Tumorerkrankungen (60 %) des Menschen und einigen Tumorarten bei Tieren nachweislich eine Mutation im Gen für dieses Protein vorliegt, steht es im Fokus der Aufmerksamkeit umfangreicher Forschungsarbeiten zur Pathogenese neoplastischer Erkrankungen, so auch bei FISS. Während die Anfänge genetischer Studien zur Ätiologie des FISS sich auf lichtmikroskopischer Ebene mit Veränderungen der Chromosomenanzahl und -struktur beschäftigten, untersuchen neueste Forschungsansätze aus den USA Variationen einzelner Nukleotide mit

molekulargenetischen Methoden. Dabei stellte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Auftreten einer bestimmten Variante im p53-Gen und dem FISS heraus. Ziel dieser Arbeit ist es, anhand einer Vergleichsstudie mit Katzen aus dem mitteleuropäischen Raum diese Korrelation zu überprüfen. Falls die Korrelation sich bestätigen sollte, wäre damit die Basis für die Entwicklung eines Tests auf eine gewisse Prädisposition für FISS gegeben und somit die Basis möglicher klinischer Anwendungen der genetischen Variante als diagnostisches Hilfsmittel, so dass Früherkennung und Prophylaxe des FISS in Zukunft mehr Gewicht gegeben werden könnte.

II Literaturübersicht

1. Das feline Injektionsstellen-assoziierte Sarkom

Das FISS ist ein aggressiver Tumor des Unterhautbindegewebes mit lokal invasivem Wachstumsverhalten und geringer Metastasierungsrate (MARTANO *et al.*, 2011). Sein biologisches Verhalten ist durch schnelles Wachstum einer soliden, palpatorisch meist gut abgrenzbaren Masse und Ausbildung langer Zellausläufer charakterisiert, die sich weit in gesunde Gewebeschichten erstrecken. Untersuchungen mit computertomographischen Aufnahmen (CT) zeigten, dass seine tatsächliche Größe meist deutlich unterschätzt wird, da die CT-Aufnahmen Ausmessungen von doppelter Größe des zuvor ausgemessenen Tumors ergaben (MCENTEE, 2000). Daraus ergibt sich die besondere Herausforderung einer vollständigen chirurgischen Entfernung für den Operateur, da verbleibende Tumorzellinfiltrate häufig Ursprung eines Rezidivs sind. Aufgrund der geschilderten Problematik ergibt sich bei chirurgischer Exzision eine Rezidivrate bei Primärtumoren von bis zu 70 % (DAVIDSON *et al.*, 1997; HERSHEY *et al.*, 2000), sofern kein ausreichend weiter Abstand (3 - 5 cm) der Schnittlinie zum palpierbaren Tumor eingehalten werden kann, und auch mindestens eine Muskelschicht in der Tiefe mitreseziert wird, wodurch die Rezidivrate laut einer Studie auf bis zu 14 % gesenkt werden kann (PHELPS *et al.*, 2011). Eine andere Studie beschreibt Rezidivraten von 35 % bei radikaler chirurgischer Entfernung (MARTANO *et al.*, 2005); weitere Studien beschreiben Rezidivraten von 41 bis 45 % selbst bei der Kombination von radikaler chirurgischer Entfernung und Radiotherapie mit oder ohne Chemotherapie (CRONIN *et al.*, 1998; COHEN *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2002; ECKSTEIN *et al.*, 2009; MAYER *et al.*, 2009).

Histologisch zeichnen Spindelzellen, mehrkernige Riesenzellen und unterschiedlich viele pleomorphe polygonale bis histiozytäre Zellen mit milden bis deutlichen Atypien die meisten FISS, die überwiegend als Fibrosarkome, aber auch als Maligne Fibröse Histiozytome, Chondrosarkome, Osteosarkome, Rhabdomyosarkome oder undifferenzierte Sarkome klassifiziert werden, aus (KIRPENSTEIJN, 2006; MARTANO *et al.*, 2011). Alle histologischen Subtypen scheinen aus proliferierenden Fibroblasten und Myofibroblasten an

Stellen mit chronischer Entzündung zu entstehen (HENDRICK und BROOKS, 1994). Überwiegend im Randbereich der Masse sind meist entzündliche Infiltrate aus Lymphozyten und aktivierten Makrophagen zu finden. Häufig geben mehrkernige Riesenzellen dem zytologischen Bild den Charakter einer chronisch-granulomatösen Entzündung, ähnlich dem Bild einer Fremdkörper-Reaktion. Von Makrophagen phagozytiertes grau-braunes Material im nekrotischen Zentrum der Masse ist im Fall von vakzine-assoziierten Sarkomen häufig vorhanden und spiegelt deren Ätiologie wider (COUTO *et al.*, 2002).

1.1 Einteilung

Es gibt entsprechend der Einteilung nach pathogenetischen Gesichtspunkten nach HIRSCHBERGER und KESSLER (2001) 4 Arten des feline Fibrosarkoms: Das durch das Feline Sarkomvirus (FeSV) verursachte Fibrosarkom, das intraokuläre posttraumatische Fibrosarkom, das Feline Injektionsstellen-assoziierte Fibrosarkom (FISS) und das spontan auftretende Fibrosarkom.

Gegenstand dieser Abhandlung soll nur das Feline Injektionsstellen-assoziierte Fibrosarkom sein.

1.2 Historie des FISS

Seit Anfang der 1990er Jahre ist der Zusammenhang zwischen Impfungen bei Katzen und der Entstehung von aggressiven Bindegewebstumoren an typischen Impfstellen bekannt. Nachdem Ende der 1980er Jahre in Pennsylvania infolge einer Tollwutepidemie bei Waschbären die Impfvorschriften für Katzen verschärft wurden, konnte dort zwischen 1988 und 1994 ein sprunghafter Anstieg der Zahl der FISS bei Katzen beobachtet werden (HENDRICK *et al.*, 1994; DODDY *et al.*, 1996). Gleichzeitig wurden neuartige Totimpfstoffe gegen das Feline Leukämievirus (FeLV) und Tollwut auf den Markt gebracht, die Adjuvantien enthielten. Histologische Untersuchungen der Tumoren zeigten, dass Makrophagen in den Tumoren Aluminium enthielten, das in Form

von Aluminiumhydroxid als Adjuvans für Impfstoffe gebraucht wird. Demzufolge wurde angenommen, dass adjuvantienhaltige Impfstoffe die Fibrosarkomentstehung verursachten. Nachdem jedoch Berichte über Fälle von FISS bekannt wurden, die nach Impfungen ohne Adjuvans entstanden, musste diese Theorie erweitert werden (HENDRICK *et al.*, 1992; OGILVIE und MOORE, 1995). Durch epidemiologische Untersuchungen wurde dann ein Zusammenhang zwischen Impfungen gegen Tollwut und FeLV und den Tumoren diskutiert (HENDRICK *et al.*, 1994; ESPLIN 1996; COYNE *et al.*, 1997), später musste dieser Zusammenhang jedoch auch auf andere Impfungen erweitert werden, als sich zeigte, dass auch nach Impfungen gegen Rhinotracheitis und Panleukopenie Sarkome entstanden (KASS *et al.*, 1993; HENDRICK *et al.*, 1994; LESTER *et al.*, 1996; BURTON und MASON, 1997; COYNE *et al.*, 1997; MCENTEE und PAGE, 2001).

Im Verlauf weiterer Untersuchungen mussten Injektionen von Präparaten mit Langzeitwirkung wie Lufenuron, Penicillin oder Methylprednisolonacetat ebenfalls als potentiell sarkomauslösend eingestuft werden, da Fallberichten zufolge nach Injektionen dieser Präparate die typischen Sarkome an den Injektionsstellen entstanden (ESPLIN *et al.*, 1999; KASS *et al.*, 2003). Mittlerweile konnten einzelne Fallberichte sogar nichtresorbierbares Nahtmaterial (BURACCO *et al.*, 2002) sowie Mikrochip-Implantationen mit der Entstehung von FISS in Zusammenhang bringen (CARMINATO *et al.*, 2001; DALY *et al.*, 2008). Die aktuellste Erweiterung dieser Liste betrifft den Bericht über eine ungeimpfte Katze, die auf eine Injektion mit dem rasch resorbierbaren Medikament Meloxidyl mit Fibrosarkomentstehung reagierte (MUNDAY *et al.*, 2011).

1.3 Ätiopathogenese

Die Ätiologie dieser Erkrankung ist, abgesehen von Impfungen und Injektionen als offensichtlichem Auslöser, multifaktoriell und noch nicht vollständig geklärt. Iatrogene, lokale und genetische Faktoren tragen zur Tumorentstehung bei. Man nimmt an, dass im Rahmen eines mehrstufigen Geschehens geweber reizende, traumatisierende oder Fremdkörper-ähnliche Effekte von Impfungen oder Injektionen in empfänglichen Individuen einen chronisch-

granulomatösen Entzündungsprozess anstoßen, der zur malignen Transformation führt (JELINEK, 2003; KIRPENSTEIJN, 2006).

1.3.1 Chronisch-granulomatöse Entzündung

Das Gewebe eines vielzelligen Organismus reagiert auf endogene und exogene Noxen, die zu Zell- oder Gewebsschädigung führen, wie z. B. Traumata, Verletzungen oder Infektionen sowie auf Zell- und Gewebsuntergang (Ausnahme: Apoptose) mit Entzündung, um den Organismus vor größerem Schaden zu bewahren. Durch den Entzündungsprozess, der mit Hyperämie, erhöhter Gefäßpermeabilität im Bereich der Kapillaren und Chemotaxis einhergeht, gelangen vermehrt Abwehrzellen an die betreffende Stelle, und im Zuge immunologischer Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-8 (IL-8) und verschiedene andere Entzündungsmediatoren wird die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die Granulozytenaktivierung und die Chemotaxis gefördert. Vor allem in späteren Phasen der Entzündung steht die zelluläre Entzündungsreaktion mit Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen im Vordergrund, und es werden Regenerationsprozesse wie die Bildung von Granulationsgewebe in Gang gesetzt. Granulationsgewebe besteht aus jungen Kapillaren, Fibroblasten und einigen Entzündungszellen. Aktivierte Makrophagen setzen die angiogenetisch wirkenden Faktoren basic Fibroblast Growth Factor (FGF-b) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) frei. Die Wachstumsfaktoren Platelet Derived Growth Factor (PDGF), FGF und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) mediiere die Migration und Proliferation von Fibroblasten. Die Entzündung ist ein protektiver Prozess, der es dem Organismus i. d. R. ermöglicht, die Noxe zu beseitigen, den Schaden lokal zu begrenzen und geschädigtes Gewebe zu ersetzen oder zu reparieren. Gelangt ein Fremdkörper oder Fremdkörper-ähnliches Material unter die Haut, kommt es zur chronisch-granulomatösen Entzündung, da der Entzündungsreiz nicht eliminiert werden kann. Aktivierte T-Helferzellen und Makrophagen produzieren Zytokine, da die üblichen Phagozytosevorgänge nicht zur Eliminierung des Fremdmaterials ausreichen. Durch Fusion von Makrophagen entstehen bisweilen mehrkernige

Riesenzellen, ein Charakteristikum der granulomatösen Entzündung. Schließlich setzt ein Prozess der bindegewebigen Abkapselung ein, wodurch das Fremdmaterial vom übrigen Körper abgegrenzt werden soll, da es nicht eliminiert werden kann (FEND und THOMAS, 2003). Beim FISS vermutet man, dass durch Impfungen oder andere Injektionen ausgelöste Fremdkörperreaktions-ähnliche Veränderungen zu einer persistierenden Entzündung mit ihren vielfältigen Zytokinwirkungen führen, nachgewiesenermaßen PDGF, FGF-b und TGF- α . Dadurch kann eine unkontrollierte Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten in disponierten Individuen zur Tumorentstehung führen, unter anderem durch Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (HENDRICK *et al.*, 1994; MACY und HENDRICK, 1996; HENDRICK, 1998; MCENTEE und PAGE, 2001; JELINEK, 2003; MARTANO *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang wurden Übergangsstadien von entzündlichen Granulomen zu FISS histologisch nachgewiesen, was diese Theorie unterstützt (HENDRICK, 1999).

Die proinflammatorischen Faktoren FGF-a und FGF-b schaffen eine günstige Umgebung für die Expression von Onkogenen und die darauf folgende Entstehung von Tumoren, wie in einer Studie mit dem Rous-Sarkomvirus in Hühnern nachgewiesen wurde. Unterdrückte man die Entzündung, konnte die Tumorentstehung in den mit dem Rous-Sarkomvirus infizierten Hühnern verhindert werden (MARTINS-GREEN *et al.*, 1994).

1.3.2 Genetische Prädisposition

Verschiedene Fakten suggerieren die Beteiligung einer genetischen Prädisposition für die Entwicklung eines FISS. Im Gegensatz zu den meisten anderen Tumorarten, wie auch das spontan auftretende Fibrosarkom, die zumeist bei älteren Tieren auftreten, tritt das FISS auch schon bei Katzen jüngeren Alters auf (DODDY *et al.*, 1996). Das durchschnittliche Alter lag in der Studie von DODDY *et al.* beim FISS bei 8,6 Jahren (Median 8 Jahre), wohingegen der Durchschnittswert bei spontan auftretenden Fibrosarkomen bei 10,2 Jahren lag (Median 11 Jahre). Bei FISS wurde zudem eine bimodale Altersverteilung mit einem gehäuften Vorkommen mit 6-7 Jahren und einer

weiteren Häufung bei einem Alter von 10 - 11 Jahren beobachtet (KASS *et al.*, 1993). Außerdem wurde beobachtet, dass es bisweilen eine Häufung von FISS-Fällen unter miteinander verwandten Katzen wie Geschwisterkatzen gibt (MARTANO *et al.*, 2005). Bisweilen gibt es Katzen, die wiederholt an verschiedenen Injektionsstellen ein FISS entwickeln. Manche FISS-Patienten entwickelten zusätzlich andere Tumoren (MADEWELL *et al.*, 2004). KIRPENSTEIJN nennt in seiner Veröffentlichung aus dem Jahr 2006 verschiedene genetisch bedingte, prädisponierende Faktoren für FISS: Eine vermehrte Expression des Thrombozyten-Wachstumsfaktors platelet derived growth factor (PDGF) und seines Rezeptors, PDGFR, unterscheidet das FISS vom nicht Injektionsstellen-assoziierten Sarkom (HENDRICK 1998). Zudem wurde eine vermehrte Expression des p53-Proteins im Zellkern von 56 % der FISS-Zellen gefunden, eine vermehrte zytoplasmatische Expression des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF-b) in 40 % der FISS-Zellen und eine vermehrte zytoplasmatische Expression von transforming growth factor α und β (TGF- α , TGF- β) in FISS-Zellen (NIETO *et al.*, 2003). Auch NAMBIAR und Mitarbeiter bewiesen im Jahr 2000, dass die mit immunhistochemischen Methoden nachweisbare Überexpression des p53 Proteins in FISS-Zellen in 62,5 % (fünf von acht) der Fälle mit Mutationen in Kernregionen des p53-Gens korreliert, wohingegen diese Mutationen in keinem nicht-neoplastischen Gewebe oder in Tumorgewebe ohne die vermehrte Expression von p53 nachgewiesen werden konnten.

PETTERINO und Mitarbeiter beschrieben den Transkriptionsfaktor STAT3 als signifikant mit dem histologischen Tumorgrad korrelierten Proliferationsmarker, dessen Expression durch Chemotherapie gesenkt werden konnte (PETTERINO *et al.*, 2006).

Weitere Gewebefaktoren, die in FISS gefunden wurden, sind Matrix-Metalloproteinasen, jedoch ließen sich keine Unterschiede des Expressionsprofils im Vergleich zu anderen Tumorarten beobachten. Die Proteinasen MMP2 und MT-MMP16 waren jedoch signifikant mit der Überlebenszeit von FISS-Patienten korreliert (SORENSEN *et al.*, 2004). Die Autoren der Studie sehen durch ihre Ergebnisse die Theorie der entzündlich bedingten Ätiologie des FISS gestützt.

SMITH und Mitarbeiter untersuchten in ihrer Studie die Expression des

Tyrosinkinase-Rezeptorproteins KIT in feline Fibrosarkomen. KIT wird vom zellulären Homolog des feline Sarkomvirus-Onkogens v-kit, c-kit, kodiert. Sie stellten jedoch fest, dass KIT zwar in 26 % der Tumoren immunhistochemisch nachweisbar war, jedoch ließ sich kein Zusammenhang der Expression mit dem histologischen Grad und auch keine Spezifität für Injektionsstellen-assoziierte Sarkome herstellen (SMITH *et al.*, 2009).

1.3.2.1 Numerische und strukturelle Chromosomenveränderungen

Zu Beginn konzentrierte sich die Forschung auf zytogenetische Auffälligkeiten in Proben von feline Sarkomen. KALAT und Mitarbeiter veröffentlichten 1991 den Fall eines feline Fibrosarkoms mit hyperdiploidem Chromosomensatz (40 - 46 Chromosomen anstatt 38 Chromosomen), der in allen untersuchten Zellen gefunden wurde (KALAT *et al.*, 1991). MAYR und Mitarbeiter konnten ebenfalls 1991 den Fall eines Fibrosarkoms aufzeigen, in dem 69,2 % der Zellen einen nahezu triploiden Chromosomensatz (51 - 64 Chromosomen) aufwiesen (MAYR *et al.*, 1991). Im Jahr 1994 veröffentlichten MAYR und Mitarbeiter in einer weiteren Studie den Fall von Trisomie des Chromosoms D1 in 20 % der Zellen in einem Fibrosarkom und in 25 % der Zellen eines weiteren Fibrosarkoms das große Markerchromosom F1 (MAYR *et al.*, 1994). MAYR und Mitarbeiter zeigten 1996 in einer weiteren zytogenetischen Analyse von vier feline Fibrosarkomen die genetische Heterogenität der Tumoren. Jedes Tier wies andere klonale Chromosomenaberrationen auf. Es wurden eine Chromosomendeletion, ein Marker-Chromosom und zwei reziproke Translokationen nachgewiesen (MAYR *et al.*, 1996). In einer weiteren zytogenetischen Untersuchung von zwei malignen fibrösen Histiozytomen (MFH), einem Fibrom und einem Fibrosarkom (FSA) zeigten sich erneut Veränderungen des Karyotyps, Translokationen, Fusionen und Deletionen verschiedener Chromosomenabschnitte (A3, B2, B3, C2, D3, E1). Die Veränderungen waren in den einzelnen Tumoren höchst unterschiedlich und nicht spezifisch für eine bestimmte Tumorart, jedoch war in allen drei malignen Tumoren (zwei MFHs, ein FSA) das Chromosom E1, auf dem das p53-Gen liegt, betroffen, wohingegen dieses Chromosom bei dem gutartigen Fibrom nicht betroffen war (MAYR, *et al.* 1998). Bei den genannten Studien gibt es keine Angabe darüber,

ob es sich um injektionsstellen-assoziierte oder spontan aufgetretene Fibrosarkome handelte. HOOTS und MCNIEL beschrieben jedoch in ihren Untersuchungen ebenfalls chromosomale Aberrationen in FISS (HOOTS, 2001; MCNIEL, 2001). Insgesamt lässt sich anhand dieser Beobachtungen die markante genetische Instabilität bei dieser Tumorart ablesen.

1.3.2.2 Genmutationen

Es existieren zahlreiche Studien über spezifische genetische Veränderungen in histologischen Proben von feline Fibrosarkomen. Im besonderen Interesse steht das Gen für das Tumorsuppressorprotein p53, denn es ist das bekannteste und am besten erforschte Protein mit regulatorischer Funktion im Zellzyklus und protektiver Funktion für die genetische Stabilität, und hier treten bei Krebsarten des Menschen am häufigsten Mutationen auf. Zudem deuteten bereits zytogenetische Untersuchungen auf eine Häufung der Aberrationen des Chromosoms E1 bei bösartigen Sarkomen, dem Chromosom, auf dem das p53-Gen lokalisiert ist (MAYR *et al.*, 1998). MAYR und Mitarbeiter beschrieben schon 1995 in einer vergleichenden Sequenzanalyse der wichtigsten Regionen des feline p53-Gens bei verschiedenen Tumoren und tumorfreien Gewebeproben gesunder Katzen Veränderungen der Gensequenz bei zwei Katzen mit Fibrosarkom: Beide Mutationen lagen in evolutionär konservierten Regionen des Gens und führten durch Austausch eines einzelnen Nukleotids zur Veränderung der Aminosäuresequenz im Genprodukt (MAYR *et al.*, 1995). Leider lagen bei dieser Studie keine Blutproben der betreffenden Katzen vor, so dass nicht überprüft werden konnte, ob es sich um rein somatische Veränderungen oder um Mutationen mit Ursprung in der Keimbahn handelte. Somatische Mutationen treten im Laufe des Lebens eines Individuums bei der weiteren Teilung und Differenzierung von Körperzellen auf, können Tumoren auslösen, werden jedoch nicht vererbt.

Anders verhält es sich bei Keimbahnmutationen: Sie werden vererbt, denn sie treten in der DNA der Keimbahn (Eizellen, Spermien und deren Vorläufer) auf. Keimbahnmutationen haben in der Regel keine direkten Auswirkungen auf den Organismus, in dem sie entstehen.

Eine sogenannte „stille“ Mutation, die keine Veränderung in der

Aminosäuresequenz nach sich zieht, wurde in der gleichen Studie in mehreren Gewebeproben gesunder und tumorkranker Katzen in der homozygoten und heterozygoten Form gefunden (MAYR *et al.*, 1995). In einer weiteren Untersuchung zeigte sich eine 6 bp große somatische Deletion am Übergang von Exon 7 zu Intron 7, einem wichtigen Abschnitt des p53-Gens bei einem feline Fibrosarkom. Den Autoren zufolge hat eine solche Mutation an einer Splicing-Stelle mit hoher Wahrscheinlichkeit ein höchst fehlerhaftes Genprodukt zur Folge, das heißt ein defektes Tumorsuppressorprotein. Zudem gilt der Abschnitt des Gens in der humanmedizinischen Forschung als Tumor-Hotspot, der bei zahlreichen Tumorarten des Menschen Veränderungen aufweist (DE VRIES *et al.*, 1996; HOLLSTEIN *et al.*, 1996).

MAYR und Mitarbeiter fanden in einer weiteren Untersuchung des p53-Gens im Blut und im Tumorgewebe von 60 Katzen mit verschiedenen Neoplasien in sieben Fällen Mutationen im Tumorgewebe. Von diesen sieben Fällen waren drei FSA und ein MFH. Die hier gefundenen somatischen Mutationen befanden sich erneut im Bereich sog. Tumor-Hotspots und hatten entweder einen Aminosäureaustausch zur Folge oder bildeten ein Stopp-Codon (MAYR *et al.*, 2000). NAMBIAR und Mitarbeiter kamen durch vergleichende immunhistochemische Untersuchungen an neoplastischem und nicht-neoplastischem Gewebe von 21 FISS-Proben sowie sequenzanalytischen Untersuchungen des p53-Gens zu dem Schluss, dass der immunhistochemische Nachweis von p53 gut mit den über Sequenzanalyse festgestellten Mutationen des p53-Gens übereinstimmt. Natürlich vorkommende, von Mutationen nicht betroffene p53-Moleküle lassen sich aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit von etwa 15 Minuten immunhistochemisch nicht nachweisen. Mutationen führen zur Stabilisierung des Proteins und dadurch zum verzögerten Abbau. Jedoch sind die Mutationen den Autoren zufolge nicht zwangsläufig prädisponierend für FISS, denn sie waren nur in einem Teil der FISS-Proben vorhanden und nicht in nicht-neoplastischen Gewebe (NAMBIAR *et al.*, 2000; NAMBIAR *et al.*, 2001). Demzufolge bleibt unklar, ob die Mutationen im Gen für das Tumorsuppressorprotein tumorauslösend waren oder ob sie nur im Verlauf der malignen Entartung entstanden und zum Fortschreiten der Erkrankung beitrugen. NIETO und Mitarbeiter zeigten in ihrer Studie von 2003, dass in 56 % der 50 immunhistochemisch untersuchten FISS-Proben das p53-Protein

im Zellkern überexprimiert wurde. Zumindest in einem Teil der Tumoren scheint demzufolge ein defektes Tumorsuppressoprotein in der Pathogenese eine Rolle zu spielen (NIETO *et al.*, 2003).

In einer weiteren Studie konnte zusätzlich der prognostische Wert des immunhistochemischen p53-Nachweises belegt werden. Zudem korrelierte in dieser Studie eine Lokalisation des Tumorsuppressorproteins im Zytoplasma gegenüber der Lokalisation im Zellkern mit einer verkürzten rezidivfreien Zeit (HERSHEY *et al.*, 2005).

1.3.2.3 Einzelnukleotidpolymorphismen

Einzelnukleotidpolymorphismen (englisch single nucleotide polymorphism, SNP) sind Variationen einzelner Nukleotide (A, T, C oder G) im Genom, durch die sich verschiedene Untergruppen von Individuen einer Population voneinander unterscheiden. Sie können in kodierenden Genabschnitten (Exons) oder in nicht-kodierenden Genabschnitten (Introns) lokalisiert sein und dementsprechend über eine veränderte Aminosäuresequenz oder Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons zu funktionellen Veränderungen führen, sie können aber auch sogenannte „stille Mutationen“ ohne direkte funktionelle Auswirkungen darstellen. Im Fall von intronischen SNPs sind ihre Effekte zum jetzigen Stand des Wissens noch nicht genau bekannt. SNPs kommen häufiger in nicht-kodierenden Abschnitten des Genoms vor. Sie tragen zur genetischen Diversität von Populationen bei, die eine bedeutende Rolle in der evolutionären Selektion und Anpassung an unterschiedliche Lebensräume und -umstände spielt. SNPs werden in der Humanmedizin für inter-individuelle Unterschiede in Haut-, Haar- und Augenfarbe, für individuelle Unverträglichkeiten sowie Dispositionen zu Adipositas, Osteoporose und andere komplexe Krankheitsbilder verantwortlich gemacht, und weitere mögliche Assoziationen mit Krankheiten mit vermuteter genetischer Komponente werden untersucht (BARREIRO *et al.*, 2008).

Sehr wenige Studien über SNPs in der Pathogenese feliner Tumoren existieren in der Tiermedizin.

MAYR und Mitarbeiter beschrieben 1998 drei C/T-Polymorphismen im felinen

p53-Gen bei gesunden Katzen in Intron 6 an Position 107, in Intron 7 an Position 14 und in Intron 7 an Position 259 (MAYR *et al.*, 1998). Bereits in einer früheren Studie von MAYR und Mitarbeitern wurde eine sog. „stille“ C/T-Variante in Exon 5 Codon 163 im somatischen felines p53-Gen beschrieben. Da von dieser Katze keine Blutprobe vorlag, konnte der Ursprung der Mutation (somatisch oder Keimbahnmutation) nicht bestimmt werden (MAYR *et al.*, 1995). BANERJI und KANIJAL fanden insgesamt acht SNPs im felines p53-Gen in Blut- und Tumorproben von 27 Katzen mit primären FISS. Sie stellten fest, dass der somatische LOH (loss of heterozygosity) dieser Stellen im p53-Gen signifikant negativ mit der rezidivfreien Zeit und der Gesamtüberlebenszeit der Katzen korreliert war (BANERJI und KANIJAL, 2006). Somatischer LOH beschreibt den Funktionsverlust eines Allels in einem Gen, in dem das andere Allel bereits inaktiviert war. Dies kann geschehen, indem eine inaktivierende Keimbahnmutation eines Allels eines Gens in der Elterngeneration geschieht und an die Nachkommen weitergegeben wird. Der Nachkomme ist heterozygot für das funktionelle Allel. LOH tritt auf, wenn das verbleibende funktionelle Allel in der Körperzelle durch eine weitere Mutation inaktiviert wird. Im Fall eines fehlenden Tumorsuppressorgens kann dies zur Tumorentstehung führen. Diese Theorie entspricht dem Two-Hit-Modell von KNUDSON, wonach der familiär-erbliche Defekt eines Allels eines Tumorsuppressorgens alleine nicht zur Kanzerogenese ausreicht, jedoch bei Verlust des zweiten Allels durch Mutation kommt es rasch zur Tumorentstehung (KNUDSON, 1971). In einer weiteren Studie von BANERJI und Mitarbeitern wurde die statistische Korrelation zwischen den polymorphen Stellen in genomischer DNA aus Blut und dem Faktor FISS in einer Fall-Kontroll-Studie analysiert. Dabei stellten sie eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Insertion eines dritten Thymidin-Nukleotids in Intron 7 an Position 246 und 247 (SNP 3) und FISS fest sowie ein signifikant häufigeres Vorkommen von C in der C/T-Variante von Exon 5 an Position 114 (SNP 1) (BANERJI *et al.*, 2007).

2. Das Tumorsuppressorprotein p53

Das auch als „Wächter des Genoms“ bekannte p53-Protein ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor (LANE, 1992; VOGELSTEIN *et al.*, 2000). Es wird bei zellulärem Stress wie DNA-Schädigung durch Bestrahlung, UV-Licht oder Chemikalien, der Überexpression von Oncogenen, Virusinfektionen oder Hypoxie aktiviert, durch posttranslationale Modifikationen stabilisiert und es bindet dann an Chromatin, um Hunderte von Downstream Targets zu aktivieren oder zu unterdrücken und somit seine vielfältigen biologischen Funktionen zu bewirken. Zu den bekanntesten Funktionen des Proteins gehören das Anhalten des Zellzyklus, um eine Reparatur schadhafter DNA-Sequenzen zu ermöglichen, Initiierung der Zellalterung und die Einleitung der Apoptose bei irreparablen Schädigungen (LEVINE und LANE, 2010; LI *et al.*, 2012). Da das p53-Protein die zahlreichen zellulären Homöostasemechanismen reguliert und die genetische Integrität von Zellen bewahrt, lässt sich somit auch seine essentielle Funktion als Tumorsuppressor erklären. Bei verschiedenen Krebsarten in der Humanmedizin werden hier am häufigsten Mutationen festgestellt (LEVINE *et al.*, 1991; GREENBLATT *et al.*, 1994; CHO *et al.*, 1994).

2.1 Struktur

Das feline p53-Protein, das dem humanen Analog in Gensequenz (82,9 % Homologie) und Aminosäuresequenz (82,1 % Homologie) sehr ähnlich ist, besteht aus 386 Aminosäuren (humanes p53-Protein: 393 Aminosäuren) (OKUDA *et al.*, 1993; OKUDA *et al.*, 1994). Das humane p53-Protein ist weitaus besser erforscht als das feline, weshalb sich die folgende Beschreibung von Struktur und Funktion auf das humane Genprodukt bezieht, die aufgrund der großen Übereinstimmung auf die feline Form übertragen werden kann. Das Protein ist ein Dimer aus zwei Dimeren, das je nach Autor in 3 bis 6 funktionelle Domänen unterteilt wird (LEVINE, 1997; BELYI *et al.*, 2010; TAIRA und YOSHIDA, 2012). Die N-terminalen ersten 42 Aminosäuren bilden die transkriptionsaktivierende Domäne 1 (TAD 1), auch bekannt als Aktivierungsdomäne 1 (AD 1), die verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Die Residuen 22 und 23 sind entscheidend für die Funktion. Der

negative Regulator von p53, MDM-2, bindet an diese Residuen und bewirkt eine α -helikale Konformation, die die Transkription und Ubiquitinierung von Lysin-Residuen in der carboxyterminalen Domäne blockiert (LIN et al., 1994; KUSSIE et al., 1996; RIPPIN et al., 2002). Eine zweite Aktivierungsdomäne (Residuen 43 bis 63) aktiviert vermutlich verschiedene durch p53 regulierte pro-apoptotische Gene im Genom. Darauf folgt die Prolin-reiche Domäne 3 (Residuen 61 bis 94), die an der Apoptose und möglicherweise an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist (WALKER und LEVINE, 1996; BELYI et al., 2010).

Die zentrale DNA-Bindungsdomäne (Residuen 102 bis 292) erkennt beschädigte DNA-Sequenzen in der Nähe von oder in den Introns der Gene, die durch p53 reguliert werden (EL-DEIRY et al., 1992). Die Domäne besteht aus einem β -Sandwich als Gerüst für zwei große Schleifen und ein Schleifen-Faltblatt-Helix-Motiv. Die zwei Schleifen werden von einem tetramerisch koordinierten Zink-Atom zusammen gehalten und bilden zusammen mit dem Schleifen-Faltblatt-Helix-Motiv die sequenzspezifische DNA-Bindungsstelle an der Oberfläche des p53-Proteins. Residuen des Schleifen-Blatt-Helix-Motivs interagieren in der großen Furche der DNA, während ein Arginin einer der beiden großen Schleifen mit der kleinen Furche interagiert (CHO et al., 1994). Dieser Abschnitt ist verantwortlich für die Bindung des p53-Co-Repressors LMO3 (LARSEN et al., 2010). Die Tetramerisierung des p53-Proteins wird durch die Aminosäure-Residuen 324 bis 355 vermittelt (JEFFREY et al., 1995; KITAYNER et al., 2006; VEPRINTSEV et al., 2006). Die carboxyterminale Domäne (Residuen 356 bis 393) reguliert die Stabilität und die DNA-Bindungsaktivität des p53-Proteins (JAYARAMAN und PRIVES, 1995). Abbildung 1 zeigt die tetramerische Struktur des p53-Proteins und seine Ausrichtung zur DNA schematisch:

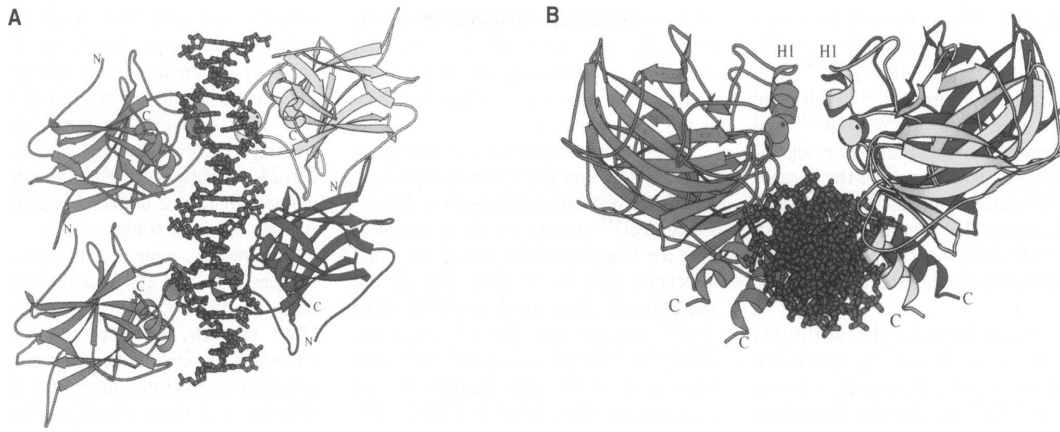


Abb. 1: Schematische Darstellung des p53-Moleküls (aus: Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Science* 1994; 265(5170): 346-55. Modifiziert).

A: Schematische Zeichnung des Tetramer-Modells mit dem DNA-Strang in vertikaler Ausrichtung.

B: Sicht auf das Tetramer-Modell mit der DNA-Achse perpendicular zur Bildebene.

2.2 Funktion

Das p53-Protein ist bekannt als entscheidender Regulator des Zellzyklus. Der Transkriptionsfaktor hat die bedeutende Aufgabe, auf zelluläre Stress-Signale verschiedenster Art zu reagieren und bei bestehenden Schäden der Gensequenz den Zellzyklus anzuhalten, um die Wiederherstellung des korrekten genetischen Codes zu ermöglichen, die Zellseneszenz oder den programmierten Zelltod, die Apoptose, einzuleiten, wenn die Schädigung zu schwerwiegend und daher irreparabel ist (TAIRA und YOSHIDA, 2012). Dies geschieht durch Hochregulation und Erhöhung der Aktivität des p53-Proteins durch zelluläre Stressoren, wodurch der Zellzyklus in der G1-Phase angehalten wird und somit die fehlerhafte Synthese von DNA in der S1-Phase verhindert wird (LEVINE *et al.*, 1994). P53 reguliert zahlreiche Downstream-Targets und wird seinerseits reguliert durch verschiedene Upstream-Targets. Seine Wirkung als Transkriptionsfaktor entfaltet es durch Bindung an spezifische Response-Elemente im Genom, indem es die Transkriptionsrate der Gene verstärkt, die

diese Elemente enthalten (EL-DEIRY *et al.*, 1992; FARMER *et al.*, 1992). Die durch p53 regulierten Gene für p21 und cdc25c können den Zellzyklus anhalten (EL-DEIRY *et al.*, 1992; LEVINE und LANE, 2010). Die das p53-Protein regulierenden Gene bax, puma, noxa, apaf-1 und andere Gene können zur Apoptose führen (SHAW *et al.*, 1992). Und schließlich kann das p53-Protein ein Programm der Zellalterung initiieren, das die Zelle zu einem terminalen replikativen Stadium führt (YONISH-ROUACH *et al.*, 1991; LEVINE und LANE, 2010). Durch diese drei Mechanismen lässt sich sehr gut erklären, weshalb das Protein die Tumorentstehung verhindert. In den vergangenen 30 Jahren sind fast 50 000 Artikel über die Familie der p53-Gene entstanden. Daraus resultieren Erkenntnisse über das weite Spektrum an Funktionen der p53-Genfamilie und deren Proteine. Diese verhindern nicht nur die Kanzerogenese, sie sind beteiligt an der Reproduktion und der Reparatur des Genoms, der Wiedergabetreue und der Rekombination, an der Regulation von Stoffwechselprozessen, Langlebigkeit, an der Überwachung der Stabilität der Entwicklung, an der Produktion von Stammzellen und an Veränderungen epigenetischer Merkmale, an der Entwicklung des Nervensystems (p73), des Immunsystems (p73) und der Haut (p63) (LEVINE und LANE, 2010).

Das MDM-2-Onkogen-Produkt ist der Haupt-Gegenspieler des p53-Proteins, an welches er sich bindet und dessen Level und Aktivität er negativ reguliert (MOMAND *et al.*, 1992). MDM-4 und WIP-1-Phosphatase sind weitere Negativ-Regulatoren von p53. HAUSP ist ein Positiv-Regulator von p53 (MEEK und ANDERSON, 2009; PERRY, 2010; LU, 2010). Die Reaktion auf Stress-Signale wird üblicherweise über Modifikationen dieser Regulatoren mediiert (LEVINE und LANE, 2010).

2.3 Verankerung von p53 im Genom

Das p53-Protein ist speziesübergreifend im Genom verankert und in bestimmten Schlüssel-Abschnitten evolutionär konserviert. Man nimmt an, dass der Vorläufer der Genfamilie p63, p73 und p53 bereits vor einer Milliarde Jahren in einfachen Lebensformen wie metazoischen Seeanemonen und möglicherweise selbst einzelligen Choanoflagellaten angelegt war. Seine Funktion bestand zunächst im Schutz der genetischen Stabilität der Keimbahn-

DNA der Gameten, bevor im Rahmen der Evolution zu komplexeren Organismen wie Wirbeltiere die Entwicklung somatischer Stammzellen mit der Funktion der Gewebserneuerung stattfand, und sich das Gen zum Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor weiterentwickelte (BELYI *et al.*, 2010). Somit fand im Rahmen der Evolution einfacher Lebensformen zu den höher entwickelten Säugetieren auch eine Diversifizierung des Gens und seiner Funktionen statt. Das heute bekannte humane sowie das feline p53-Gen bestehen aus 11 kodierenden Abschnitten (Exons) und ebenso vielen nichtkodierenden Abschnitten (Introns). Die Exons 5 bis 8 enthalten die evolutionär konservierten Regionen (I - V), in denen bei verschiedenen Krebsarten des Menschen am häufigsten Mutationen auftreten (LEVINE *et al.*, 1994). Das feline p53-Gen wurde auf dem Chromosom E1 lokalisiert und enthält 2143 Basenpaare (OKUDA *et al.*, 1993; OKUDA *et al.*, 1994).

3. Mutationen im p53-Gen als Bestandteil der Tumorentstehung

Die maligne Entartung eines Gewebes ist das Resultat verschiedener schädigender Einflüsse auf die genetische Information von Zellen, wodurch es zu morphologischen und funktionellen Abweichungen kommt. Insbesondere ist ein Kriterium der Malignität, dass sich eine entartete Zelle dem regulierenden Einfluss des Gewebsverbandes entzieht und sich aus diesem lösen kann. Die Schädigungen der DNA somatischer Stammzellen treten meist im Laufe des Lebens durch mutagene Noxen wie Chemikalien, ionisierende Strahlung oder Radikale auf. Oder aber es besteht eine familiäre Disposition zu Neoplasien, wobei bestimmte Mutationen bereits mit der DNA der Keimbahn vererbt wurden (SCHMID *et al.*, 2003). P53-Mutationen spielen eine besondere Rolle in der Tumorentstehung, da das Molekül eine so entscheidende Funktion in der Zellzyklusregulation einnimmt und somit die maligne Entartung von Zellen verhindert. Mutationen, die ein weniger effektives, defektes oder fehlendes Tumorsuppressorprotein zur Folge haben, bieten einen entscheidenden Selektionsvorteil für entartete Zellen, da ihre Proliferation durch den Regulator nicht behindert wird. Genetische Veränderungen wie Missense-Mutationen, vorzeitige Stopp-Codons oder Deletionen können unkontrolliert an die neu entstehenden Zellen weitergegeben werden (LEVINE *et al.*, 1993). Besonders

häufig sind mutmaßlich kanzerogene p53-Mutationen in den Abschnitten des Gens lokalisiert, die für die Funktion entscheidende Bereiche des Proteins, die DNA-bindenden Abschnitte, kodieren (CHO *et al.*, 1994).

3.1 Humanmedizin

Das p53-Gen ist in 60 % aller Tumoren beim Menschen durch sporadische oder erbliche Mutationen involviert (LEVINE *et al.*, 1991). In 85,6 % tritt in der Kanzerogenese mit Beteiligung des p53-Gens zunächst eine Missense-Mutation auf einem Allel auf, was in einem fehlerhaften p53-Protein resultiert, woraufhin eine Selektion zum homozygoten Zustand stattfindet, die im vollständigen Verlust des Wildtyp-Allels resultiert (LEVINE *et al.*, 1994).

Beim Menschen ist beispielsweise das seltene Li-Fraumeni-Syndrom als genetische Prädisposition für verschiedene Krebsarten, wie Karzinome und Sarkome, die bereits in jungem Alter auftreten, beschrieben. Es handelt sich dabei um eine autosomal-dominante Erbkrankheit, die durch das Auftreten verschiedener Tumorarten an unterschiedlichen Stellen des Körpers charakterisiert wird. Betroffene Familien haben eine sehr hohe Krebsrate, besonders häufig treten osteogene Sarkome auf. Bei allen untersuchten Li-Fraumeni-Familien wurden Mutations-Cluster zwischen Codon 245 und 258 des p53-Gens gefunden, wovon mindestens zwei Mutationen im Codon 248 erblich waren. Individuen, die heterozygot für den Gendefekt in der Keimbahn-DNA sind, haben ein sehr hohes Risiko, an Krebs zu erkranken (MALKIN *et al.*, 1990; SRIVASTAVA *et al.*, 1990). Das Tumorgewebe betroffener Personen enthält das mutierte Allel, welches i. d. R. in den homozygoten Zustand reduziert worden ist, so dass im Tumor kein Wildtyp-Allel mehr vorhanden ist (LEVINE *et al.*, 1991; LEVINE *et al.*, 1994). Weitere Tumorarten, bei denen die Beteiligung von somatischen p53-Mutationen sehr gut beschrieben ist, sind das kolorektale Karzinom, bei dem es in 75 – 80 % zum funktionellen Verlust beider p53-Allele kommt, und das kleinzellige Bronchialkarzinom, bei dem in 100 % der Fälle p53-Mutationen vorkommen (HOLLSTEIN *et al.*, 1991; LEVINE *et al.*, 1991). Bei Lungenkrebs, Brustkrebs, Gehirntumoren und bei chronischer myeloischer Leukämie in der Blastenkrise tritt ein funktioneller Verlust beider p53-Allele auf

(TAKAHASHI *et al.*, 1989; JAMES *et al.*, 1989; MACKAY *et al.*, 1988; KELMAN *et al.*, 1989).

3.2 Tiermedizin

Auch im Bereich der Tiermedizin sind bei zahlreichen Tumorarten in verschiedenen Tierspezies Mutationen des p53-Gens oder eine abnormale Expression des p53-Proteins beschrieben worden. Hier ist der zahlenmäßige Anteil der Tumoren, bei denen die p53-Veränderungen festgestellt werden können, jedoch nicht so überwältigend hoch wie in der Humanmedizin. Weiterhin muss die tierartspezifische Variabilität auch innerhalb derselben Klasse von Tumoren in der Tiermedizin beachtet werden. Teilweise resultieren Forschungsansätze auch innerhalb der gleichen Spezies und derselben Tumorart in gegensätzlichen Ergebnissen. Insgesamt ist die Beteiligung von Mutationen des p53-Proteins in der Kanzerogenese bei Tieren noch weitaus weniger gut erforscht, als in der Humanmedizin. Beispiele für Tumorarten der Katze, bei denen p53-Mutationen gefunden wurden, sind das Lymphom (OKUDA *et al.*, 1994), das FSA (MAYR *et al.*, 1995; MAYR *et al.*, 1998; MAYR *et al.*, 2000), das Osteosarkom (MAYR *et al.*, 1998; NASIR *et al.*, 2000), das Mammakarzinom (MAYR *et al.*, 1998; MAYR *et al.*, 2000; NASIR *et al.*, 2000), das Spindelzellsarkom und das pleomorphe Sarkom (MAYR *et al.*, 1998), das MFH und das undifferenzierte Karzinom der Haut (MAYR *et al.*, 2000), das Plattenepithelkarzinom (MAYR *et al.*, 2000; NASIR *et al.*, 2000), das Adenokarzinom (NASIR *et al.*, 2000) und das Hämangiosarkom (NASIR *et al.*, 2000). In der Untersuchung von NASIR und Mitarbeitern erwiesen sich hingegen feline Lymphome und Fibrosarkome, welche hier nicht genauer in Untergruppen unterteilt wurden, als negativ für p53-Mutationen (NASIR *et al.*, 2000).

Speziell beim FISS wiesen verschiedene Autoren mit verschiedenen Methoden hingegen somatische p53-Mutationen und Keimbahnmutationen des Gens nach (NAMBIAR *et al.*, 2000; NAMBIAR *et al.*, 2001; NIETO *et al.*, 2003; BANERJI und KANJILAL, 2006; BANERJI *et al.*, 2007).

Bei Hunden wurden in wenigen Fällen von Gehirntumoren p53-Mutationen

nachgewiesen (YORK *et al.*, 2012), zudem bei Hauttumoren (JASIK und REICHERT, 2011), bei Osteosarkomen (KIRPENSTEIJN *et al.*, 2008) und bei Mammatumoren (LEE *et al.*, 2004).

III Publikation

Lack of association between p53 SNP and FISS in a cat population from Germany

D. Mucha¹, S. Laberke¹, S. Meyer², and J. Hirschberger¹

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Veterinärstr. 13, D-80539 Munich

² Department of Psychiatry and Psychotherapy, Ludwig Maximilian University, Nußbaumstr. 7, D-80336 Munich

Address correspondence to J. Hirschberger at the address above, or email: hirschberger@lmu.de

1. Abstract

One recent study indicates a significant association between certain single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genomic sequence of feline p53 and feline injection-site sarcoma (FISS). The aim of this study was to investigate the correlation between a specific nucleotide insertion in p53 gene and FISS in a German cat population. Blood samples from 150 German cats were allocated to a control group consisting of 100 healthy cats and a FISS-group consisting of 50 cats with FISS. All blood samples were examined for the presence of the SNP in the p53 gene. Results found the T-insertion at SNP 3 in 20.0 % of the cats in the FISS-group and 19.2 % of cats in the control-group. No statistically significant difference was observed in allelic distribution between the two groups. Further investigations are necessary to determine the association of SNPs in the feline p53 gene and the occurrence of FISS.

Keywords: Comparative oncology; Genetics; Molecular diagnostics; Risk factor; SNP

2. Introduction

Feline injection-site sarcoma (FISS) is a rare severe iatrogenic complication of vaccinations or other injections in cats. Hendrick and Goldschmidt were the first to describe FISS in 1991, when they discussed the possibility that vaccine site reactions could induce fibrosarcomas in cats.¹ Their continued research later led to the characterisation of the newly emerging disease.² Characteristics of FISS, formerly named vaccine-site associated sarcomas, include their apparent occurrence in younger cats, their more aggressive biological behaviour and their inflammatory component, compared to their spontaneously developing counterpart.²⁻⁴ The etiologic relationship of injections and the infrequent occurrence of a chronic granulomatous inflammation at injection sites are well-established in the pathogenesis of FISS.⁵⁻⁷ The most recognized theory on the pathogenesis of FISS describes a multistep carcinogenesis model due to traumatic incidents such as injections which lead to an exaggerated inflammatory response. This response to the foreign material promotes the transformation to sarcoma in genetically tumor-susceptible feline individuals.⁸ As research on FISS aetiology continues⁹, questions arise about the genetic factors that may be responsible for the tumor-susceptibility in certain cats.

Genetic factors influencing the occurrence and development of FISS have not been conclusively determined.¹⁰⁻¹² Reports about the heritability of FISS in siblings and cat families or FISS patients affected by other tumors exist,¹³ but have yet to be proven in large multi-institutional studies.

The tumor suppressor gene, p53, is affected by alterations in most, if not all, types of cancer in humans.¹⁴ The p53 gene was first identified in cats in 1993.¹⁵ This gene encodes for the p53 protein which plays an essential role in cellular homeostasis and DNA repair. P53 also regulates the induction of apoptosis in cells with irreparable structural DNA damage.¹⁶

Mutations which significantly alter the p53 gene sequence can affect cell cycle regulation in cats which can lead to the proliferation of defective cells.¹⁷ This state in the cell cycle can facilitate neoplastic transformation. Several studies reported mutational alterations of the p53 gene and an altered p53 expression in feline sarcoma.¹⁸⁻²² Some reports even described a correlation between somatic alterations of the p53 gene and the prognosis of FISS.^{23, 24}

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are variations of single base pairs within the genetic code. They contribute to the inter-individual genetic variability. Although direct impact on protein function is rare, SNPs are thought to be responsible for a number of differences in metabolic pathways and some constitute risk factors for certain diseases.²⁵

Banerji and Kanjilal discovered 7 additional SNPs in feline p53 gene after a comprehensive study on 27 FISS cats in 2006. Twenty cats carrying the SNPs showed somatic loss of heterozygosity at more than one polymorphic site in fibrosarcoma tissue, and a significant negative correlation of somatic loss of heterozygosity with overall outcome was observed.²⁴ A statistically significant association between FISS and SNP 1 and SNP 3 in germline DNA was detected in a subsequent study in 2007. The single thymidine (T) insertion to the existing 2 thymidines at positions 246 and 247 in intron 7 named SNP 3 (GenBank accession numbers DQ119105 and AF175762) revealed the strongest statistical significance.¹⁰

FISS is an extremely aggressive cancer form and multimodal therapy including extensive surgery is often insufficient to prevent recurrence.⁹ The detection of predisposing hereditary risk factors such as SNPs plays a key role in early detection and prevention of FISS.

The aim of this study is to verify the association between SNP 3 and FISS in a German cat population to investigate the usefulness of the rare allele of SNP 3 as a potential FISS marker. If the strong association was confirmed, this SNP could be a valuable tool for early detection of FISS predisposition in apparently healthy cats and investigations should be expanded to other SNP candidates. The study design is based on the study design of Banerji *et al.*¹⁰ for purposes of comparability (Fig. 1).

3. Materials and Methods

Animals

This matched case-control study included 150 male and female cats of various breeds, but mostly Domestic Shorthair cats (DSH) (Table 1). The FISS-group consisted of 50 cats diagnosed with FISS at the Clinic of Small Animal Medicine, University of Munich, referred by veterinary practitioners for treatment of FISS. All FISS-group cats were client-owned pets that had a documented history of growing masses at injection sites and the diagnosis FISS was confirmed by their histopathology reports. Control group cats were free of FISS or any other cancer at the time of sample collection. Their vaccination status was similar to the FISS group. The 100 control group cats and the information on their medical history and clinical examination were acquired in the line with a previous study at the Clinic of Small Animal Medicine, University of Munich.²⁶

Both FISS and control cats were FIV- and FeLV-negative and had no history of radiation therapy or chemotherapy. Cats of both study groups were matched by age (mean age of control group 8.59 years, range 3-18; mean age of case group 9.74 years, range 3-17).

Blood sample collection and storage

The study used EDTA blood samples of case group cats generated by blood examinations in the course of clinical health status monitoring. The anticoagulated specimens were stored in commercially available tubes (1.5 ml Safe-Lock Eppendorf tube, Eppendorf Germany, Hamburg, Germany) at –20°C until processed for DNA extraction. Extracted DNA from blood samples of control group cats was already available in the course of a previous study in our clinic and was stored at the same conditions.²⁶

DNA extraction

Genomic DNA from the blood samples was extracted and purified using a commercially available Kit (QIAamp® Blood Mini Kit, QIAGEN® GmbH,

Hilden, Germany).

Amplification of p53 intron 7 to intron 8 by PCR assay and SNP-Test

The genomic DNA of all cats was tested for SNP 3 using a custom TaqMan SNP genotyping assay (Custom TaqMan® Assays, Applied Biosystems, Forster City, CA). Each reaction mix contained 5µl (1–100ng) of genomic DNA template, 0.625µl Primer/Probe Mix (0.9µM of both primers, 0.2µM of both probes), 12.5µl Type it Fast SNP PCR Master Mix and 6.88µl RNase free water in a total volume of 25µl.

PCR cycling was performed under the following conditions: activation of HotStarTaq® Plus DNA Polymerase for 5min at 95°C, 40 cycles of denaturation for 15s at 95°C and a period of annealing and extension for 30s at 60°C (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Forster City, CA).

Statistical analysis

Genotypes and single-allele frequencies at SNP 3 site were determined for both case and control cats. Conditional logistic regression analysis in the dominant model was used to calculate the odds ratio (OR) and its confidence interval (CI) for the single-allele frequencies at SNP 3. For the control group, cats with ages similar to those in the case group were selected to form groups of comparable age structures. An unpaired t-test was performed on mean ages of both groups. The minor allele frequency (MAF) of SNP 3 in the study population was calculated and compared with the MAF of the accordant SNP in the US precursor study population.

For all statistical analyses, $P < 0.05$ was considered to be significant. The statistical software environment R 2.12.1 (Statistical software environment R 2.12.1, R Development Core Team (2010), R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used to perform the conditional logistic regression, all other analyses were conducted with SPSS version 15.0 (SPSS 15.0, Version 15.0.1, Copyright © SPSS Inc. 2006, Chicago, IL, USA).

4. Results

Animals

A total of 149 cats were used in the study for statistical evaluation. One cat from the control group developed splenic mast cell tumor disease after sample collection and was excluded from the statistical analysis. The FISS group consisted of 50 cats with a mean age of 9.74 +/- 3.04 years (median, 10 years; range 3-17 years); the mean age of 99 tumor-free control cats was 8.59 +/- 3.79 years (median 8 years; range 3-18 years).

Breed distribution is shown in Table 1. Cats of both gender were included. There were 26 male cats and 24 female cats in the FISS group. There were 60 male cats, 38 female cats and one cat of unknown gender in the control group.

Statistical Analysis

Conditional logistic regression analysis in the dominant model performed on genotypes and single allele frequencies at SNP 3 in case and control group did not reveal any correlation between the T-insertion and the disease occurrence with an OR of 0.98 (95% CI = 0.40-2.38; P = 0.963). The insertion of a third T nucleotide at SNP 3 was present in ten of the 50 FISS cases (20 %). Nine of these cats were heterozygous (T3/T2) and one cat was homozygous for the allele. In the tumor-free control group, 19 cats (19.2 %) were positive for the T3 allele. Eighteen control cats harboured the rare allele in the heterozygous state and one cat was homozygous for the insertion of the third T nucleotide.

The unpaired t-test comparing the groups with respect to their mean age resulted in a P-value of 0.047.

The MAF of SNP 3 in the German cat population was 0.10 while it was 0.12 in the group of US cats (Fig. 2 and Table 2).

5. Discussion

The aim of this study was to investigate the correlation between a specific nucleotide insertion in p53 gene and the occurrence of FISS in a German cat population. For purposes of comparability, this study's design was based on the study design of Banerji *et al* 2007 who identified the highly significant association of SNP 3 and FISS in an American cat population.¹⁰ Contrary to the previous study results, the genetic disposition to FISS cannot be assigned to the insertion of a third thymidine at SNP 3 in the feline p53 gene according to our study results.

A possible explanation for the extremely diverging results is a false positive association in the precursor study, because there is a great potential for Type I errors in SNP association studies.²⁷ The intronic SNP 3 does not lead to any amino acid substitution in the coding region of the gene.¹⁰ Although some intronic alterations of human p53 gene described in the rare Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome lead to alternately spliced forms of p53 protein,²⁸ the exact functional impact of most intronic SNPs is scarcely known or unknown. Thus, the correlation of most intronic SNPs with certain diseases is strictly statistical and underlies the influence of coincidence and other sources of error.

In human medicine, genome-wide association studies (GWAS) and approaches of candidate gene analysis are performed resulting in sea of data reporting associations of SNPs with almost any kind of metabolic or cancer disease. However, those associations are often inconsistent or only consistent in a small percentage of SNPs.^{27, 29} Type I and Type II errors frequently occur and cannot be completely ruled out in both SNP association studies. The importance of reproducible data on SNP disease associations, created in independent studies, must be pronounced in this context.

Since the MAF of a SNP is known to affect the likelihood to obtain false positives in association studies,³⁰ a comparison of the calculated MAF of SNP 3 in the US cat population in question with the MAF in this study population was performed. The frequency of SNP 3 lies far above the crucial value of 0.05, below which SNPs usually are excluded from statistical analysis due to concerns to inflate the number of false-positives. The MAFs appear similar in

both populations and the slight difference can hardly explain the utterly different results of the two studies.

However, the common statistical methods on genetic association studies themselves are currently under debate, indicating the complexity of the topic.³⁰⁻

33

But as the methods used in both studies were similar, it appears unlikely that deficiencies in the statistical methods could have caused the extremely diverging results.

Although the results of this study seem very clear, general conclusions should not be drawn without considering the following limitations:

One potential source of divergence is genetic epidemiology. Banerji's study included exclusively DSH cats from the USA, whereas in our study the German cat population was constituted by mostly DSH cats but also some cats of various other breeds were included. As feline genomics still is at an early stage, the molecular genomic characteristics of different cat breeds e.g. in terms of SNPs are sparsely known, and large comparative genetic studies on feline genomics in different parts of the world are also still missing. Learning from GWAS experience in dog genomics, it is important to interpret genetic observations in the context of breed-specific molecular genomic characteristics. The lack of information about intercontinental and breed-specific differences in the domestic cat genome is complicating the correct interpretation of the study's results. The US domestic cat population might be descended from European domestic cats more than 250 years ago, but how much they differ genetically today has not been thoroughly investigated. Though the frequency of SNP 3 was found to be similar in both the US and the German cat population, the presence or absence of additional genes possibly conferring effects to a phenotype could make up for different results. Monogenetic effects are known to be rare, whereas gene-gene interactions are supposed to contribute to the expression of a certain phenotype. Hence, it is indeed possible that a genetic disposition to FISS as described by Banerji *et al* 2007 can be assigned to certain p53 SNPs in a potentially inbred cat population in the USA, but not in the German cat population examined in this study.¹⁰

On the other hand, world-wide, the domestic cat population is very

heterogenic and FISS is not restricted to certain breeds. A potential test on SNP 3 as a diagnostic tool for predisposition to FISS should preferably be usable for all cat breeds.

Another limitation concerning the design of this study might be that well defined risk factors to FISS development such as the number of vaccines administered in the individual cats, known to increase the risk of tumorigenesis by 50% with a single vaccination, 127% with two vaccinations at a site, and 175% when 3 or more vaccinations are simultaneously administered, were not included in the analysis.³⁴ Additionally, the mean age of the control group is 1.15 years lower than the mean age of the FISS group, what causes some uncertainty about a part of the healthy control group cats which could eventually have an onset of FISS in later years, and there is no follow-up information about the cats' health status. Blood samples of the FISS group were collected first, and then the tumor-free control group was chosen out of a historical study population.²⁶ Trying to obtain a comparable mean age, the oldest tumor-free cats were chosen from the rather young study population.²⁶ Additionally, in the conditional logistic regression the odds ratio is estimated with the data being stratified by age group, i.e. the comparisons are performed on matching sets with two cats from the control group and one cat from the case group based on similar ages of these cats. Thus, the analysis is inherently adjusted for the confounding variable "age" and the impact of the difference in mean age between the two groups is minimized.

Apart from epidemiologic influences on the cat populations and the limitations concerning the slight mean age difference between the FISS group and the control group, no significant differences were found after comparing the methods and the design of the two studies.

Testing to determine the risk for FISS should not only be excluded to testing for a single intronic SNP but should include other factors such as the immunologic status, and empirical factors such as adverse injection reactions or persistent chronic inflammation caused by other instances observed before, or cat family members with FISS occurrence. Perhaps in the future it will be possible to further elucidate the molecular clues to the exaggerated inflammatory response to trauma caused by injections in feline tissue which usually precedes FISS development. Jelínek discussed already in 2003 the role

of an age-related immunological disposition, possibly responsible for a reaction to foreign material in older cats after vaccination instead of a reaction to immunogen, as observed in younger cats.¹² Considering recent reports on FISS development not only after vaccinations but also after microchip implantation^{35, 36} and even injection of rapidly absorbed medication such as meloxicam,³⁷ the disposition of feline tissue to chronic granulomatous inflammation and neoplastic transformation seems to increase. This could hint to a genetic disposition not only with regard to a defective tumour suppressor mechanism, but especially with regard to a defective immunological status. Establishing an individual risk scale for FISS development, evaluating both clinical history and laboratory test findings on genetic and immunological risk factors already known⁸ could help to assess the risk in the future. Given the complex puzzle of genetics, further investigations on feline functional genomics and genetic epidemiology are necessary to elucidate the multistep-carcinogenesis of FISS on the molecular level.

6. Source of Funding

The authors thank the Dr. Karl Heinz Kurtze foundation, LMU, Munich, Germany, for providing financial support to this research project.

7. Conflict of Interest

There is no conflict of interest originating from financial support or any other involvement of institutional, private or corporate influence. The Dr. Karl Heinz Kurtze foundation is an independent, non-profit organisation.

8. Acknowledgements

The authors thank Dr. Karin Weber, DVM, for her essential help with the laboratory work, and Dr. Rose-Leah Austin-Busse, DVM, for proof-reading and correcting the English language usage.

9. References

1. Hendrick MJ and Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991; **199**: 968.
2. Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ and Gliatto JM. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1994; **205**: 1425-9.
3. Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW and Janovitz EB. Feline Fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *Journal of Comparative Pathology* 1996; **114**: 165-74.
4. Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS and Somlyo AP. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminium. *Cancer research* 1992; **52**: 5391-4.
5. O'Byrne KJ and Dalglish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *British Journal of Cancer* 2001; **85**: 473-483.

6. Nieto A, Sánchez MA, Martínez E and Rollán E. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Veterinary Pathology* 2003; **40**: 651-8.
7. Hendrick MJ and Brooks JJ. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 1994; **31**: 126-9.
8. Kirpensteijn J. Feline injection-site associated sarcoma: Is it a reason to critically evaluate our vaccination policies? *Veterinary Microbiology* 2006; **117**: 59-65.
9. Martano M, Morello E and Buracco P. Feline injection-site sarcoma: Past, present and future perspectives. *The Veterinary Journal* 2011; **188**: 136-41.
10. Banerji N, Kapur V and Kanjilal S. Association of Germ-line polymorphisms in the Feline p53 Gene with Genetic Predisposition to Vaccine-Associated Feline Sarcoma. *Journal of Heredity* 2007; **98**: 421-427.
11. McNiel EA. Vaccine-associated sarcomas in cats: a unique cancer model. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; **382**: 21-7.
12. Jelínek F. Postinflammatory sarcoma in cats. *Experimental and toxicologic pathology: official Journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 2003; **55**: 167-72.

13. Martano M, Morello E, Ughetto M, Iussich S, Petterino C, Cascio P and Buracco P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *The Veterinary Journal* 2005; **170**: 84-90.
14. Polager S and Ginsberg D. P53 and E2F: partners in life and death. *Nature* 2009; **9**: 738-48.
15. Okuda M, Umeda A, Matsumoto Y, Momoi Y, Watari T, Goitsuka R, O'Brien SJ, Tsujimoto H and Hasegawa A. Molecular cloning and chromosomal mapping of feline p53 tumor suppressor gene. *The Journal of Veterinary Medical Science* 1993; **55**: 801-5.
16. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**: 323-331.
17. Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M and Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 1994; **54**: 4855-78.
18. Mayr B, Schaffner G, Kurzbauer R, Schneider A, Reifinger M and Loupal G. Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *The British Veterinary Journal* 1995; **151**: 707-13.
19. Mayr B, Wegschneider H, Reifinger M and Jugl T. Cytogenetic alterations in four feline soft-tissue tumours. *Veterinary Research Communications* 1998; **22**: 21-9.

20. Mayr B, Reifinger M, Alton K and Schaffner G. Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Veterinary Research Communications* 1998; **22**: 249-55.
21. Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA and Jackson ML. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *American Journal of Veterinary Research* 2000; **61**: 1277-81.
22. Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA and Haines DM. Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in Feline injection site-associated sarcomas. *Veterinary Pathology* 2001; **38**: 236-8.
23. Hershey AE, Dubielzig RR, Padilla ML and Helfand SC. Abberant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Veterinary Pathology* 2005; **42**: 805-11.
24. Banerji N and Kanjilal S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *American Journal of Veterinary Research* 2006; **67**: 1766-72.
25. Mullikin JC, Hansen NF, Shen L, Ebling H, Donahue WF, Tao W, Saranga DJ, Brand A, Rubenfield MJ, Young AC, Cruz P, Driscoll C, David V, Al-Murrani SWK, Lochniskar MF, Abrahamsen MS, O'Brien SJ, Smith OR and Brockmann JA. Light whole genome sequence for SNP discovery across domestic cat breeds. *BMC Genomics* 2010; **11**: 406.

26. Laberke S, Just F, Pfister K and Hartmann K. Prevalence of feline haemoplasma infection in cats in Southern Bavaria, Germany, and infection risk factor analysis. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2010; **123**: 42-8.

27. Hong H, Shi L, Su Z, Ge W, Jones WD, Czika W, Miclus K, Lambert CG, Vega SC, Zhang J, Ning B, Liu J, Green B, Xu L, Fang H, Perkins R, Lin SM, Jafari N, Park K, Ahn T, Chierici M, Furlanello C, Zhang L, Wolfinger RD, Goodsaid F and Tong W. Assessing sources of inconsistencies in genotypes and their effects on genome-wide association studies with HapMap samples. *Pharmacogenomics Journal* 2010; **10**: 364-74.

28. Barel D, Avigad S, Mor C, Fogel M, Cohen IJ and Zaizov R. A novel germline mutation in the noncoding region of the p53 gene in a Li-Fraumeni family. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1998. **103**: 1-6.

29. Balasubbu S, Sundaresan P, Rajendran A, Ramasamy K, Govindarajan G, Perumalsamy N and Hejtmancik JF. Association analysis of nine candidate gene polymorphisms in Indian patients with type 2 diabetic retinopathy. *BMC Medical Genetics* 2010; **11**: 158.

30. Tabangin ME, Woo JG and Martin LJ. The effect of minor allele frequency on the likelihood of obtaining false positives. *BMC Proceedings* 2009; **3**: 41; doi: 10.1186/1753-6561-3-S7-S41.

31. Ahn K, Gordon D and Finch SJ. Increase of Rejection Rate in Case-Control Studies with the Differential Genotyping Error Rates. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 2009; 8: Article 25; doi: 10.2202/1544-6115.1429.

32. Nsengimana J and Bishop DT. Design considerations for genetic linkage and association studies. *Methods in Molecular Biology* 2012; **850**: 237-62.
33. Lourenço VM, Pires AM and Kirst M. Robust linear regression methods in association studies. *Bioinformatics* 2011; **27**: 815-21.
34. Kass PH, Barnes WG Jr, Spangler WL, Chomel BB and Culbertson MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1993; **203**: 396-405.
35. Daly MK, Saba CF, Crochik SS, Howerth EW, Kosarek CE, Cornell KK, Roberts RE and Northrup NC. Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2008; **10**: 202-205.
36. Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchiotti E and Mutinelli F. Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Veterinary Dermatology* 2011; **22**: 565-9. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.00975.x.
37. Munday JS, Banyay K, Aberdeen D and French AF. Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2011; **13**: 988-91.

10. Figure legends

Table 1:

^a Domestic Shorthair

^b European Longhair

^c British Shorthair

^d Oriental Shorthair

Table 2:

^a Comparisons performed by conditional logistic regression with age defining the matching sets.

^b Values significant at $P < 0.05$

Figure 1:

The relative positions of SNP sites 1 through 8 are shown in relation to the genomic sequence of feline p53 exons 5 through intron 8. The sites included T/C polymorphisms at the third base of exon 5 codon 163 (SNP1), intron 7 nucleotide positions 14 (SNP2) and 259 (SNP4), and intron 8 positions 15 (SNP5) and 70 (SNP8); A/G polymorphisms at positions 16 (SNP6) and 20 (SNP7); and a single thymidine (T) insertion to the existing 2 thymidines at positions 246 and 247 (SNP3) in intron 7 (GenBank accession numbers DQ119105 and AF175762; figure and text according to Banerji N. *et al* 2007, modified).

Figure 2:

p = genotypes at SNP 3 in case and control group cats

q = proportion of cats in %

11. Tables

Table 1. Breed distribution in FISS group and control group

Breed	FISS group	Control group
DSH ^a	42	72
ELH ^b	4	0
Maine Coon/-Mix	2	1
Norwegian Forest Cat	1	2
Angora/-Mix	1	1
Persian	0	12
Crossbred	0	3
Abyssinian	0	2
Siamese	0	1
Russian Blue	0	1
Tonkinese	0	1
BSH ^c	0	1
OSH ^d	0	1
Not reported	0	1

Table 2. Genotypes and allele frequencies for SNP 3 in the feline p53 gene in cases and controls.

SNP site	Genotype	Cases	Controls	OR(95% CI) ^a	P ^b
SNP3	T2/T2	40	80	0.98(0.40-2.28)	0.963
	T3/T2	9	18		
	T3/T3	1	1		
Allele frequency		T3=0.11/T2=0.89	T3=0.10/T2=0.90		

12. Figures

Figure 1

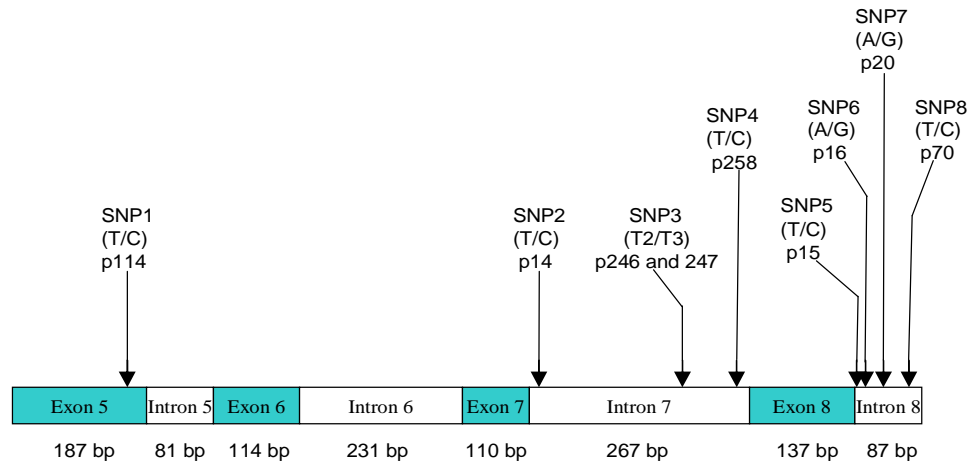
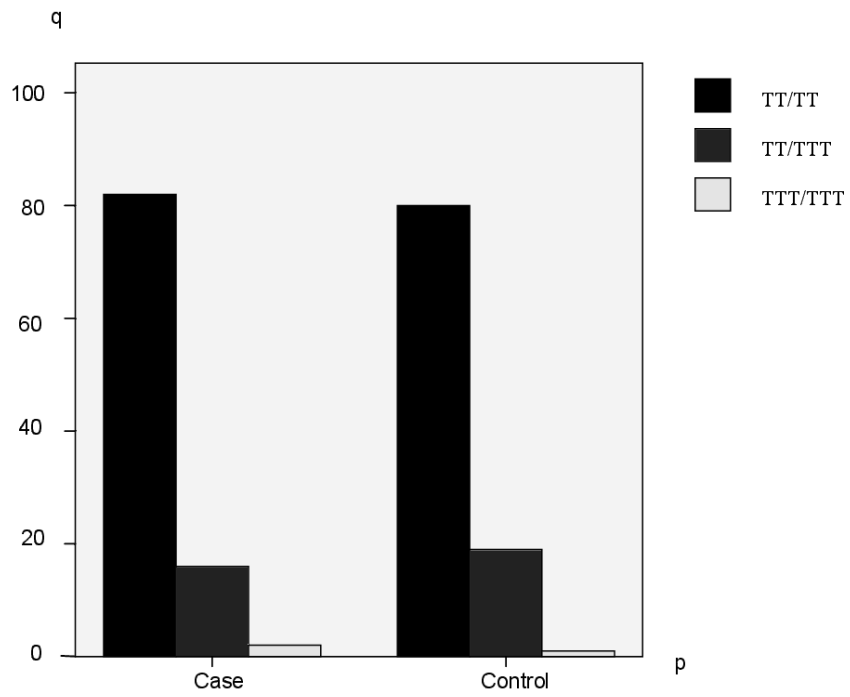


Figure 2



13. Letter of Acceptance

Veterinary and Comparative Oncology - Decision on Manuscript VCO-2012-030.R2

Von: david.argyle@ed.ac.uk

An: daniela_mucha@web.de

Datum: 03.07.2012 18:34:30 03-Jul-2012

Dear Ms. Mucha,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Lack of association between p53 SNP and FISS in a cat population from Germany" in its current form for publication in Veterinary and Comparative Oncology.

Thank you for your fine contribution and on behalf of the Editors of Veterinary and Comparative Oncology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Yours sincerely,

Prof. David Argyle

Co-Editor, Veterinary and Comparative Oncology

david.argyle@ed.ac.uk

IV Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, den Zusammenhang zwischen einer spezifischen Nukleotidinsertion im p53-Gen und dem Risiko des Auftretens von FISS in einer Katzenpopulation aus dem süddeutschen Raum zu analysieren. Die Hypothese einer genetischen Assoziation der Krankheit mit dieser Variante und möglicherweise einem weiteren Einzelnukleotidpolymorphismus war im Jahr 2007 von Banerji et al. aufgrund von eigenen Forschungsergebnissen aus Minnesota, USA, in einem Originalartikel aufgestellt worden. Um die Vergleichbarkeit der beiden Studien zu gewährleisten entspricht die vorliegende Studie in Aufbau und Methodik im Wesentlichen der Vorgängerstudie von Banerji et al. aus dem Jahr 2007, die die hochsignifikante Assoziation der als SNP 3 bezeichneten Variante im feline p53-Gen mit dem Faktor FISS in einer US-amerikanischen Katzenpopulation identifiziert hatten (BANERJI *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der zitierten früheren Studie, kann unseren Ergebnissen zufolge die genetische Prädisposition für FISS nicht der Insertion eines dritten Thymidinnukleotids an p246 und 247 im Intron 7 des feline p53-Gens zugeordnet werden.

Eine mögliche Erklärung für diese so unterschiedlichen Ergebnisse ist eine falsch-positive Assoziation in der früheren Studie. In SNP-Assoziationsstudien existiert ein großes Potential für Fehler erster (falsch-positive Assoziation) und zweiter (falsch-negative Assoziation) Ordnung (HONG *et al.*, 2010). Der intronische SNP 3 führt nicht zur Aminosäuresubstitution in kodierenden Genabschnitten (BANERJI *et al.*, 2007). Obwohl einige intronische Veränderungen des humanen p53-Gens, die bei dem seltenen Li-Fraumeni-Syndrom beschrieben wurden, einem erblichen Syndrom, das die Disposition zu mehreren Arten von Tumoren in einer Person beinhaltet, über alternatives Splicing zu differierenden p53-Proteinen führen (BAREL *et al.*, 1998), sind die genauen funktionellen Auswirkungen der meisten intronischen SNPs kaum bekannt. Daher ist die Korrelation der meisten intronischen SNPs mit bestimmten Krankheiten statistischer Natur und unterliegt dem Einfluss von Zufall und anderen Fehlerquellen.

In der Humanmedizin werden inzwischen immer neue genomweite Assoziationsstudien (genome-wide association studies, GWAS) und Studien

mit dem Ansatz der Kandidatengen-Analyse publiziert, die in einer Flut von Daten über Korrelationen von SNPs mit verschiedenen Stoffwechselerkrankungen oder Krebs resultieren. Jedoch sind diese Korrelationen häufig nicht in neuen Populationen reproduzierbar oder nur bei einem kleinen Prozentsatz der SNPs (HONG *et al.*, 2010; BALASUBBU *et al.*, 2010). Fehler erster und zweiter Ordnung treten häufig auf und können sowohl in dieser als auch in der vorausgegangenen SNP-Assoziationsstudie nicht völlig ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang muss betont werden, wie wichtig es ist, reproduzierbare Daten in unabhängigen Studien hervorzubringen, bevor aus scheinbaren Korrelationen von SNPs mit bestimmten Krankheiten weitreichende Schlussfolgerungen gezogen werden.

Da die MAF (Minor allele frequency) eines SNPs die Wahrscheinlichkeit für ein falsch-positives Ergebnis in Assoziationsstudien beeinflusst (Tabangin *et al.*, 2009), wurden die berechneten MAFs von SNP 3 in der US-Studienpopulation und in der Population dieser Studie miteinander verglichen. Die MAF von SNP 3 liegt deutlich über dem kritischen Wert von 0,05. SNPs mit MAFs unter diesem Wert, deren selteneres Allel also noch seltener in der untersuchten Population vorkommt, werden üblicherweise von statistischen Analysen ausgeschlossen, um zu vermeiden, dass die Anzahl der falsch-positiven Assoziationen unnötig ansteigt. Die MAFs beider Populationen sind sehr ähnlich und können daher die so unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien kaum erklären.

Jedoch sind die für genetische Assoziationsstudien derzeit üblichen statistischen Methoden selbst Gegenstand von Studien, was die Komplexität des Themas andeutet (TABANGIN *et al.*, 2009; AHN *et al.*, 2009; NSENGIMANA und BISHOP, 2012; LOURENÇO *et al.*, 2011).

Da die verwendeten Methoden der beiden Vergleichsstudien jedoch im Wesentlichen identisch waren, erscheint es unwahrscheinlich, dass Fehler in der Statistik die sehr unterschiedlichen Resultate verursacht haben könnten.

Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Studie eindeutig erscheinen, sollten keine allgemeinen Schlüsse daraus gezogen werden, ohne die folgenden limitierenden Faktoren zu bedenken:

Eine mögliche Ursache für unterschiedliche Ergebnisse liegt in der genetischen

Epidemiologie. Die zitierte Studie von BANERJI und Mitarbeitern von 2007 bezog sich ausschließlich auf Katzen der Rasse Domestic Shorthair, welche das Pendant zur sogenannten „Hauskatze“ oder Europäisch Kurzhaar in Europa darstellt. In unserer Studie stellte zwar die Rasse Europäisch Kurzhaar die überwiegende Mehrheit der Studienpopulation, jedoch wurden auch einige Katzen anderer Rassen aufgenommen. Da das Wissen über das feline Genom noch nicht sehr ausgereift ist, sind auch die genetischen Charakteristika verschiedener Katzenrassen, die sich z. B. in verschiedenen SNPs ausprägen könnten, bisher kaum bekannt, und es gibt bisher auch noch keine großen vergleichenden Studien über die Unterschiede im Genom von Katzen aus verschiedenen Teilen der Welt. Aus der Erfahrung mit GWAS beim Hund ist bekannt, wie wichtig es ist, genetische Beobachtungen im Kontext rassespezifischer molekulargenetischer Charakteristika zu interpretieren. Der Mangel an gesicherten Informationen über rassespezifische und durch die unterschiedliche Herkunft bedingte Unterschiede im Genom der Hauskatze macht die korrekte Interpretation der Ergebnisse dieser Studie noch schwieriger. Zwar mag die Hauskatzenpopulation der USA ursprünglich von Hauskatzen aus Europa abstammen, die vor über 250 Jahren den genetischen Pool begründeten, inwiefern sie sich jedoch inzwischen genetisch von ihren Vorfahren entfernt hat, wurde bisher noch nicht gründlich erforscht. Obwohl die Häufigkeit des Auftretens von SNP 3 in der Studienpopulation aus den USA und in der Deutschen Studienpopulation nahezu gleich war, könnte das Vorhandensein oder die Abwesenheit zusätzlicher Gene zur Ausprägung eines Phänotyps beitragen und daher zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Es ist bekannt, dass monogenetische Effekte die absolute Ausnahme in der Genotyp-Phänotyp-Beziehung darstellen, wohingegen meist multiple Interaktionen zwischen verschiedenen Genen zur Ausprägung eines bestimmten Phänotyps beitragen. Daher besteht in der Tat die Möglichkeit, dass eine genetische Prädisposition für FISS, wie sie von BANERJI *et al.* im Jahr 2007 beschrieben wurde, in einer möglicherweise von Inzucht betroffenen Katzenpopulation in den USA bestimmten SNPs zugeordnet werden kann, jedoch nicht in der Deutschen Katzenpopulation, die in dieser Studie untersucht wurde (BANERJI *et al.*, 2007).

Andererseits ist die Hauskatzenpopulation weltweit sehr heterogen und FISS

ist nicht auf bestimmte Rassen beschränkt. Ein hypothetischer Test auf SNP 3 als diagnostisches Hilfsmittel für die Früherkennung einer genetischen Prädisposition für FISS sollte möglichst bei allen Rassen anwendbar sein.

Ein weiterer limitierender Faktor, der das Studiendesign betrifft, ist die Nichtberücksichtigung bekannter Risikofaktoren wie etwa die Anzahl der Impfungen, die die einzelnen Katzen an einer Lokalisation erhalten hatten. Es ist bekannt, dass sich das Risiko der Tumorentstehung mit einer Impfung um 50 % erhöht, bei zwei Impfungen an einer Stelle um 127 %, und bei drei oder mehr simultanen Impfungen erhöht sich das Risiko um 175 % (KASS *et al.*, 1993). Zudem ist das durchschnittliche Alter der Kontrollgruppe um 1,15 Jahre niedriger als das durchschnittliche Alter der FISS-Gruppe, was eine gewisse Unsicherheit darüber bewirkt, ob ein Teil der gesunden Katzen der Kontrollgruppe nicht später in ihrem Leben FISS entwickeln würden; es gibt kein mehrjähriges Follow-Up dieser Katzen. Die Blutproben der FISS-Gruppe wurden zuerst gesammelt und die tumorfreie Kontrollgruppe wurde später aus einer historischen Studienpopulation ausgewählt (LABERKE *et al.*, 2010). Um ein vergleichbares Durchschnittsalter zu erhalten, wurden möglichst alte tumorfreie Katzen aus der eher jungen Studienpopulation ausgewählt (LABERKE *et al.*, 2010). Außerdem wird in der konditionellen logistischen Regression die Odds Ratio mit Daten geschätzt, die durch Altersgruppen stratifiziert wurden, d. h. die Vergleiche werden mit Matching Sets durchgeführt, die aus zwei Katzen der Kontrollgruppe und einer Katze der Fallgruppe bestehen, deren Alter ähnlich ist. Dadurch wird die Analyse auf die gemeinsame Variable „Alter“ adjustiert, und die Auswirkungen des Unterschieds des Durchschnittsalters zwischen den beiden Gruppen werden minimiert.

Abgesehen von den epidemiologischen Einflüssen auf die Katzenpopulationen und den beschriebenen limitierenden Faktoren, die den geringen Unterschied im Durchschnittsalter zwischen der FISS-Gruppe und der Kontrollgruppe betreffen, kann man beim Vergleich von Methodik und Design der beiden Studien keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Die Bestimmung des Risikos für FISS kann nicht auf den Test auf einen einzelnen intronischen SNP beschränkt sein, sondern sollte weitere Faktoren wie den immunologischen Status und empirische Faktoren mit einschließen,

wie etwa bereits früher aufgetretene adverse Injektionsreaktionen oder persistierende chronische Entzündungen durch andere Auslöser, oder Familienmitglieder mit FISS. Vielleicht wird es in der Zukunft möglich sein, die molekularen Mechanismen besser aufzuklären, die zu der übersteigerten Entzündungsreaktion auf das Injektionstrauma in felinem Gewebe führen, die normalerweise der Entwicklung von FISS vorausgeht. Jelínek diskutierte bereits 2003 die Rolle einer altersabhängigen immunologischen Disposition, die möglicherweise bei älteren Katzen zu einer Fremdkörperreaktion nach der Impfung führt anstelle der erwünschten Reaktion auf das Immunogen, wie sie üblicherweise bei jüngeren Katzen auftritt (JELINEK, 2003). Wenn man die jüngsten Berichte über Fälle von FISS bedenkt, die nicht nur nach Impfungen, sondern auch nach Implantation eines Mikrochips (DALY *et al.*, 2008; CARMINATO *et al.*, 2001) und sogar nach der Injektion von rasch resorbierten Substanzen wie Meloxicam auftraten (MUNDAY *et al.*, 2011), scheint die Disposition von felinem Gewebe zur chronisch-granulomatösen Entzündung und zur neoplastischen Transformation hoch zu sein. Dies könnte auf eine genetische Disposition hindeuten, die nicht nur auf einem fehlerhaften Tumorsuppressormechanismus beruht, sondern insbesondere auch auf einem mangelhaften immunologischen Status. Die Etablierung einer individuellen Risiko-Skala für die FISS-Entstehung, welche sowohl Anamnese und klinische Erscheinungen als auch labordiagnostische Erkenntnisse der Katze über bekannte genetische und immunologische Risikofaktoren (KIRPENSTEIJN, 2006) miteinbezieht, könnte zukünftig helfen, das Risiko besser einzuschätzen. Wenn man die Komplexität der Genetik betrachtet, sind weitere Untersuchungen der vielstufigen Karzinogenese von FISS auf molekularer Ebene unabdingbar, um diese aufzuklären.

V Zusammenfassung

SNPs (single nucleotide polymorphisms) als inter-individuelle genetische Variationen können in der Medizin als Marker für Dispositionen zu verschiedenen komplexen Krankheiten mit genetischer Komponente genutzt werden. In der Erforschung des FISS (Feline injection-site sarcoma) geht man von einer genetische Disposition mancher Katzen für die Krankheit aus, diese konnte jedoch bisher nicht eindeutig einem Gen oder genetischen Marker zugeordnet werden. Die US-amerikanische Studie von BANERJI und Mitarbeitern demonstrierte erstmals einen hochsignifikanten Zusammenhang (OR = 8,99; 95 % CI = 3,42 - 23,57; $p < 0,0001$) zwischen der SNP 3 genannten Variante im Intron 7 des feline p53-Gens und dem Faktor FISS und begründet darauf Hoffnungen für den Einsatz dieses SNP als FISS-Marker in klinisch gesunden Katzen (BANERJI *et al.*, 2007). Die vorliegende Studie zeigt bei gleichem Studienaufbau und gleicher -methodik jedoch völlig von diesen Resultaten abweichende Ergebnisse, wonach kein Zusammenhang zwischen dem SNP mit den höchsten Signifikanzwerten und FISS besteht (OR = 0,98; 95 % CI = 0.40 - 2.38; $p = 0,963$). Demnach eignet sich der untersuchte SNP 3 zumindest nicht als weltweit einsetzbarer Marker zur Früherkennung einer Prädisposition für FISS.

Da sich die Forschung über das feline Genom noch in einem frühen Stadium befindet, ist die richtige Einordnung des Ergebnisses jedoch schwierig. Der Mangel an Informationen über natürlich vorkommenden SNPs und rassespezifische sowie herkunftsbezogene Unterschiede im Genom der Katze lässt viele Fragen unbeantwortet. Es bedarf weiterer funktioneller und epidemiologischer Untersuchungen von SNPs im feline Genom, um Fortschritte im Verständnis der molekularen Pathogenese des FISS zu erzielen.

VI Summary

SNPs (single nucleotide polymorphisms) are variations of single nucleotides in the genetic code of individuals. They can be used as markers for predilections to complex diseases with a genetic component in their aetiology. In research on FISS (Feline injection-site sarcoma) some cats are believed to be genetically predisposed to the disease. The kind of genetic predilection, however, could not be assigned to a specific gene or genetic marker so far. The US study of Banerji and others first demonstrated a highly significant correlation between the genetic variant in intron 7 of feline p53 gene, named SNP 3, and FISS (OR = 8.99; 95 % CI = 3.42-23.57; $p < 0.0001$). The authors of the study utter hopes for the use of the SNP as a marker for FISS in clinically healthy cats (BANERJI *et al.*, 2007). However, the present study, which simulates the US precursor study in design and methods, shows completely differing results. According to these, there is no correlation between the SNP with the highest significance values and FISS (OR = 0.98; 95 % CI = 0.40-2.38; $p = 0.963$).

Thus, the SNP is not prone to be used as a marker for early detection of a predilection to FISS, at least not for world-wide use.

Because research on feline genomics still is at an early stage, the correct interpretation of the present study's results is challenging. The lack of information about naturally occurring SNPs and both breed-specific and inter-continental differences of the feline genetic code leaves many questions unanswered. Further investigations about the function and epidemiology of SNPs in the feline genome are necessary to achieve progress in understanding the molecular aetiology of FISS.

VII Literaturverzeichnis

1. Banerji N, Kanjilal S.

Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma.

Am J Vet Res 2006; 67(10): 1766-72.

2. Banerji N, Kapur V, Kanjilal S.

Association of Germ-line Polymorphisms in the Feline p53 Gene with Genetic Predisposition to Vaccine-Associated Feline Sarcoma.

J Hered 2007; 98(5):421-7.

3. Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L.

Natural selection has driven population differentiation in modern humans.

Nat Genet 2008; 40(3): 340-5, doi: 10.1038/ng.78.

4. Belyi VA, Ak P, Markert E, Wang H, Hu W, Puzio-Kuter A, Levine AJ.

The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes.

Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(6): a001198, doi: 10.1101/cshperspect.a001198.

5. Buracco P, Martano M, Morello E, Ratto A.

Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat.

Vet J 2002; 163(1): 105-7.

6. Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchiotti E and Mutinelli F.

Microchip-associated fibrosarcoma in a cat.

Vet Dermatol 2011; 22(6): 565-9. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.00975.x.

7. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP.

Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex:
Understanding Tumorigenic Mutations.

Science 1994; 265(5170): 346-55.

8. Cohen M, Wright JC, Brawner Jr WR, Smith AN, Henderson R, Behrend EN.

Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for
treatment of vaccine associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000).

J Am Vet Med Assoc 2001; 219(11): 1582-9.

9. Cronin K, Page RL, Spodnick G, Dodge R, Hardie EN, Price GS, Ruslander D,
Thrall DE.

Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats.

Vet Radiol Ultrasound 1998; 39(1): 51-56.

10. Daly MK, Saba CF, Crochik SS, Howerth EW, Kosarek CE, Cornell KK,
Roberts RE and Northrup NC.

Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat.

J Feline Med Surg 2008; 10(2): 202-5.

11. Davidson EB, Gregory C, Kass PH.

Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats.

Vet Surg 1997; 26(4): 265-9.

12. De Vries EMG, Ricke DO, De Vries TN, Hartmann A, Blaszyk H, Liao D,
Soussi T, Kovach JS, Sommer SS.

Database of mutations in the p53 und APC tumor suppressor genes designed to
facilitate molecular epidemiological analyses.

Hum Mutat 1996; 7(3): 202-13.

13. Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB.

Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites.

J Comp Pathol. 1996; 114(2): 165-74.

14. Eckstein C, Guscetti F, Roos M, Martin de las Mulas J, Kaser-Hotz B, Rohrer Bley C.

A retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma.

Vet Comp Oncol 2009; 7(1): 54–68.

15. El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B.

Definition of a consensus binding site for p53.

Nat Genet 1992; 1(1): 45–9.

16. Esplin DG.

Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat.

Vet Cancer Soc Newsletter 1999; 23(2): 8-9.

17. Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C.

Wild-type p53 activates transcription in vitro.

Nature 1992; 358(6381): 83–6.

18. Fend F, Thomas C.

Entzündungen.

In: Büttner R, Thomas C (Herausgeber). Allgemeine Pathologie.

Stuttgart: Schattauer; 2003. S. 141-64.

19. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC.

Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular

pathogenesis.

Cancer Res 1994; 54(18): 4855–4878.

20. Hendrick MJ and Brooks JJ.

Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry.

Vet Pathol 1994; 31: 126-9.

21. Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM.

Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992).

J Am Vet Med Assoc 1994; 205(10): 1425-9.

22. Hendrick MJ.

Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis.

J Am Vet Med Assoc 1998; 213(10): 1425-6.

23. Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM.

Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996).

J Am Vet Med Assoc 2000; 216(1): 58-61.

24. Hershey AE, Dubielzig RR, Padilla ML, Helfand SC.

Aberrant p53 Expression in Feline Vaccine-associated Sarcomas and Correlation with Prognosis.

Vet Pathol 2005; 42(6):805–11.

25. Hirschberger J, Kessler M.

Das feline Fibrosarkom.

Tierärztliche Praxis 2001; 29 (K): 66-71.

26. Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC.

Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation.

Nucleic Acids Research 1996; 24(1): 141-6.

27. Hoots EA.

Characterization of Genetic Alterations in Feline Vaccine-associated Sarcoma using whole Chromosome painting probes.

J Vet Intern Med 2001; 15(3): 292.

28. James CD, Carlbom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK.
Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas.
Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86(8): 2858-62.
29. Jasik A, Reichert M.
New p53 mutations in canine skin tumors.
Vet Rec 2011; 169(26): 684.
30. Jayaraman J, Prives C.
Activation of p53 sequencespecific DNA binding by short single strands of DNA
requires the p53 C-terminus.
Cell 1995; 81(7): 1021-9.
31. Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP.
Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7
angstroms.
Science 1995; 267(5203): 1498-502.
32. Jelinek F.
Postinflammatory sarcoma in cats.
Exp Toxicol Pathol 2003; 55: 167-72.
33. Kalat M, Mayr B, Schleger W, Wagner B, Reifinger M.
Chromosomal hyperdiploidy in a feline sarcoma.
Res Vet Sci 1991; 51(2): 227-8.
34. Kass PH, Barnes WG, Spangler WL, Chromel BB, Culberston MR.
Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and
fibrosarcoma tumorigenesis in cats.
J Am Vet Med Assoc 1993; 203: 396-405.

35. Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K.

Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats.

J Am Vet Med Assoc 2003; 223 (9): 1283-92.

36. Kelman Z, Prokocimer M, Peller S, Kahn Y, Rechavi G, Manor Y, Cohen A, Rotter V.

Rearrangements in the p53 gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia.

Blood 1989; 74(7): 2318-24.

37. Kirpensteijn J, Kik M, Teske E, Rutteman GR.

TP53 gene mutations in canine osteosarcoma.

Vet Surg 2008; 37(5): 454-60.

38. Kitayner M, Rozenberg H, Kessler N, Rabinovich D, Shaulov L, Haran TE, Shakked Z.

Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers.

Mol Cell 2006; 22(6): 741-53.

39. Knudson AG.

Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma.

Proc Nat Acad Sci U S A 1971; 68(4): 820-3.

40. Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Page RL, Price GS, Williams LE, Hardie EM, Mathews KG, Thrall DE.

Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats.

Vet Radiol Ultrasound 2002; 43: 473-9.

41. Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP.

Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain.

Science 1996; 274(5289): 948-53.

42. Lane DP.
Cancer. P53, guardian of the genome.
Nature 1992; 358(6381): 15–6.
43. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A.
LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity.
Biochem Biophys Res Commun 2010; 392(3): 252-7.
44. Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK.
Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors.
J Vet Sci 2004; 5(1): 63-9.
45. Levine AJ, Momand J, Finlay CA.
The p53 tumour suppressor gene.
Nature 1991; 351(6326): 453-6.
46. Levine AJ, Chang A, Dittmer D, Notterman DA, Silver A, Thorn K, Welsh D, Wu M.
The p53 tumor suppressor gene.
J Lab Clin Med 1994; 123(6): 817-23.
47. Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D.
The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis.
Br J Cancer 1994; 69(3), 409-16.
48. Levine AJ.
P53, Cellular Gatekeeper for Growth and Division.
Cell 1997; 88: 323-331.

49. Levine AJ, Lane D.

P53 Research: The Past Thirty Years and the Next Thirty Years.

Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(12); doi: 10.1101/cshperspect.a000893

50. Li M, He Y, Feng X, Huang J.

Genome-wide studies of the transcriptional regulation by p53.

Biochim Biophys Acta 2012; 1819(7): 684-7. doi:10.1016/j.bbagr.2012.02.002

51. Lin J, Chen J, Elenbaas B, Levine AJ.

Several hydrophobic amino acids in the amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to MDM-4 and Adenovirus E1B55Kd.

Genes Dev 1994; 8(10): 1235–46.

52. Lu X.

Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53.

Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(5), doi: a000984.

53. Mackay J, Steel CM, Elder PA, Forrest AP, Evans HJ.

Allele loss on short arm of chromosome 17 in breast cancers.

Lancet 1988; 2(8625): 1384-5.

54. Macy DW, Hendrick MJ.

The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats.

Vet Clin North Am Small Anim Pract 1996; 26(1): 103-9.

55. Madewell BR, Gieger TL, Pesavento PA, Kent MS.

Vaccine site-associated sarcoma and malignant lymphoma in cats: a report of six cases (1997-2002).

J Am Anim Hosp Assoc. 2004; 40 (1): 47-50.

56. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA et al.

Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.

Science 1990; 250(4985): 1233-8.

57. Martano M, Morello E, Ughetto M, Iussich S, Petterino C, Cascio P and Buracco P.

Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases.

Vet J 2005; 170: 84-90.

58. Martano M, Morello E and Buracco P.

Feline injection-site sarcoma: Past, present and future perspectives.

Vet J 2011; 188: 136-41.

59. Martins-Green M, Boudreau N, Bissel MJ.

Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumours in chickens infected with Rous sarcoma virus.

Cancer Res 1994; 54(16): 4334-41.

60. Mayr B, Eschborn U, Kalat M.

Near tripoidy in a feline fibrosarcoma.

Zentralbl Veterinarmed A 1991; 38(8): 617-20.

61. Mayr B, Hofstadler E, Schleger W, Reifinger M, Eisenmenger E.

Trisomy D1, marker F1: new cytogenetic findings in two cases of feline fibrosarcoma.

Zentralbl Veterinarmed A 1994; 41(3): 197-201.

62. Mayr B, Schaffner G, Kurzbauer R, Schneider A, Reifinger M, Loupal G.

Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas.

Br Vet J 1995; 151(6): 707-13.

63. Mayr B, Bockstahler B, Loupal G, Reifinger M, Schleger W.
Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma.
Res Vet Sci 1996; 61(3): 268-70.
64. Mayr B, Reifinger M, Loupal G.
Polymorphisms in Feline Tumour Suppressor Gene p53.
Mutations in an Osteosarcoma and a Mammary Carcinoma.
Vet J 1998; 155(1): 103-6.
65. Mayr B, Wegscheider H, Reifinger M, Jugl T.
Cytogenetic alterations in four feline soft-tissue tumours.
Vet Res Commun 1998; 22: 21-9.
66. Mayr B, Reifinger M, Alton K, Schaffner G.
Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma,
pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats.
Vet Res Commun 1998; 22(4): 249-55.
67. Mayr B, Blauensteiner J, Edlinger A, Reifinger M, Alton K, Schaffner G,
Brem G.
Presence of p53 mutations in feline neoplasms.
Res Vet Sci 2000; 68(1): 63-70.
68. Mayer MN, Treuil PL, LaRue SM.
Radiotherapy and surgery for feline soft tissue sarcoma.
Vet Radiol Ultrasound 2009; 50: 669–72.
69. McEntee MC.
The utility of contrast enhanced computed tomography in feline vaccine
associated sarcomas: 35 cases.
Vet Radiol Ultrasound 2000; 41(6): 575.

70. McEntee MC, Page RL.

Feline vaccine-associated sarcomas.

J Vet Intern Med 2001; 15(3): 176-82.

71. McNiel EA.

Characterization of Chromosomal Aberrations in Feline Vaccine-associated Sarcoma using comparative Genomic Hybridization.

J Vet Intern Med 2001; 15(3): 292.

72. Meek DW, Anderson CW.

Post-translational modification of p53: Cooperative integrators of function.

Cold Spring Harb Perspect Biol 2009; 1(6), doi: a000950.

73. Momand J, Zambetti GP, Olsen DC, George D, Levine AJ.

The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.

Cell 1992; 69(7): 1237-45.

74. Munday JS, Banyay K, Aberdein D, French AF.

Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat.

J Feline Med Surg. 2011; 13(12): 988-91.

75. Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA, Jackson ML.

Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas.

Am J Vet Res 2000; 61(10): 1277-81.

76. Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA, Haines DM.

Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline vaccine site-associated sarcomas.

Vet Pathol 2001; 38(2): 236-8.

77. Nasir L, Krasner H, Argyle DJ, Williams A.

Immunocytochemical analysis of the tumour suppressor protein (p53) in feline neoplasia.

Cancer Lett 2000; 155(1): 1-7.

78. Nieto A, Sánchez MA, Martínez E, Rollán E.

Immunohistochemical Expression of p53, Fibroblast Growth Factor-b, and Transforming Growth Factor-a in Feline Vaccine-associated Sarcomas.

Vet Pathol 2003; 40: 651–8.

79. Okuda M, Umeda A, Matsumoto Y, Momoi Y, Watari T, Goitsuka R, Obrien SJ, Tsujimoto H, Hasegawa A.

Molecular cloning and chromosomal mapping of feline p53 tumor suppressor gene.

J Vet Med Sci 1993; 55(5): 801–5.

80. Okuda M, Umeda A, Sakai T, Ohashi T, Momoi Y, Youn HY, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A.

Cloning of feline p53 tumor-suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors.

Int J Cancer 1994; 58(4): 602-7.

81. Perry ME.

The regulation of the p53 mediated stress responses by MDM2 and MDM4.

Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(1), doi: a000968.

82. Petterino C, Martano M, Cascio P, Cerruti F, Martini M, Morello E, Bruno R, Castagnaro M, Buracco P.

Immunohistochemical Study of STAT3 Expression in Feline Injection-site Fibrosarcomas.

J Comp Pathol 2006; 134(1): 95-104.

83. Phelps HA, Kuntz CA, Milner RJ, Powers BE, Bacon NJ.

Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002).

J Am Vet Med Assoc 2011; 239(1): 97-106.

84. Rippin TM, Freund SM, Veprintsev DB, Fersht AR.

Recognition of DNA by p53 core domain and location of intermolecular contacts of cooperative binding.

J Mol Biol 2002; 319(2): 351–8.

85. Schmid KW, Thomas C, Büttner R.

Tumoren.

In: Büttner R, Thomas C (Herausgeber). Allgemeine Pathologie.

Stuttgart: Schattauer; 2003. S. 181-224.

86. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahly R, Sordat B, Costa J.

Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line.

Proc Nat Acad Sci U S A 1992; 89(10): 4495–9.

87. Smith AJ, Njaa BL, Lamm CG.

Immunohistochemical Expression of c-KIT Protein in Feline Soft Tissue Fibrosarcomas.

Vet Pathol 2009; 46: 934-9.

88. Sorensen KC, Kitchell BE, Schaeffer DJ, Mardis PE.

Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas.

Am J Vet Res 2004; 65(3): 373-9.

89. Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH.

Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome.

Nature 1990; 348(6303): 747-9.

90. Taira N, Yoshida K.

Post-translational modifications of p53 tumor suppressor: determinants of its functional targets.

Histol Histopathol 2012; 27(4): 437-43.

91. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD.

p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer.

Science 1989; 246(4929): 491-4.

92. Veprintsev DB, Freund SM, Andreeva A, Rutledge SE, Tidow H, Canadillas JM, Blair CM, Fersht AR.

Core domain interactions in full-length p53 in solution.

Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(7): 2115-9.

93. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.

Surfing the p53 network.

Nature 2000; 408(6810): 307-10.

94. Walker KK, Levine AJ.

Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression.

Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(26): 15335-40.

95. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M.

Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6.

Nature 1991; 352(6333): 345-7.

96. York D, Higgins RJ, Lecouteur RA, Wolfe AN, Grahn R, Olby N, Cambell M, Dickinson PJ.

TP 53 Mutations in Canine Brain tumors.

Vet Pathol 2012 Mar 12. (Epub ahead of print)

VIII Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des p53-Moleküls	16
---	----

Abbildungen und Tabellen in der Publikation

Table 1: Breed distribution in FISS group and control group	40
Table 2: Genotypes and allele frequencies for SNP 3 in the feline p53 gene in cases and controls	40
Fig. 1: Relative positions of SNP sites 1 through 8 in relation to the genomic sequence of feline p53 exons 5 through intron 8	41
Fig. 2: Proportion of cats in % with different genotypes at SNP 3 in case and control group	42

IX Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann bedanken, die mir die Möglichkeit zur Promotion in ihrer Klinik gegeben hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Johannes Hirschberger, der mich in seine Abteilung aufgenommen und während der gesamten Doktorarbeit fachlich und menschlich betreut hat. Er hat stets an mich geglaubt und ich habe viel von ihm gelernt. Ich danke ihm für die geduldigen Korrekturen an meiner Arbeit und für die mir entgegengebrachte Nachsicht bei meinem Perfektionismus und meiner Ungeduld.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Karin Weber für Ihre fachkompetente Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Studie sowie bei der Arbeit im Labor bedanken.

Außerdem danke ich der Dr. Karl-Heinz-Kurtze-Stiftung ganz herzlich für die großzügige finanzielle Förderung der Dissertation.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Teamkollegen und den Tierarzhelfern und Auszubildenden der Medizinischen Kleintierklinik für ihren unermüdlichen Einsatz beim Sammeln der Proben bedanken. Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Silja Laberke für die Bereitstellung des geordneten Probenmaterials für die Kontrollgruppe.

Schließlich gilt mein Dank auch den vielen Katzen mit und ohne FISS, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders herzlichen Dank möchte ich meinen engsten Freunden – ganz besonders Debbie, André, Rose, Basti, Angi und Andrea - und meiner Familie aussprechen, die mich während der Erstellung der Doktorarbeit immer wieder seelisch und moralisch aufgebaut haben und zum Durchhalten ermahnt haben. Meinen Eltern möchte ich außerdem dafür danken, dass sie mich so geduldig und lange finanziell unterstützt haben.