

**Die Rolle unterschiedlicher Mastzellsubtypen im Rahmen der
intestinalen Karzinogenese**

von Tanja Maria Groll

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

**Die Rolle unterschiedlicher Mastzellsubtypen im Rahmen der
intestinalen Karzinogenese**

von Tanja Maria Groll

aus Aalen

München 2023

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

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Angefertigt am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München

Mentorin: Priv.-Doz. Dr. Katja Steiger

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer
Univ.-Prof. Dr. Stefan Unterer
Prof. Dr. Sabine André
Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

“If you have cancer and you are a mouse, we can take good care of you.”

Judah Folkman

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Die Mastzelle	3
1.1	Mastzellnomenklatur	4
1.2	(Immun-)Histologische Charakteristika der intestinalen Mastzelle	5
1.3	Mastzellgranula	6
1.3.1	Tumorassoziierte funktionelle Aspekte mastzellulärer Proteasen	9
1.3.2	Schleimhautassoziierte Mastzellsubtypen	10
1.4	Die Rolle der Mastzelle im intestinalen Tumormikromilieu	13
1.4.1	Mastzell-Tumorzell-Interaktion	17
2	Die intestinale Karzinogenese	19
2.1	Aufbau der intestinalen Darmwand	19
2.2	Intestinale Neoplasien	20
2.2.1	Adenom-Karzinom-Sequenz	20
2.2.2	Humane intestinale Neoplasien	21
2.2.3	Ausgewählte Mausmodelle der intestinalen Karzinogenese	23
2.2.3.1	Chemisch-toxisch induzierte Mausmodelle	24
2.2.3.2	Mausmodelle mit Manipulation des Wnt-Signalweges	25
2.2.3.3	Mausmodelle mit Manipulation des MAPK-Signalweges	26
2.2.4	Feline intestinale Neoplasien	27
3	Wissenschaftliche Fragestellungen	28
III	PUBLIKATIONEN	29
1	Publikation I	29
2	Publikation II	47
IV	WEITERE ERGEBNISSE	73
1	Interepitheliale Mastzellen feliner intestinaler Neoplasien	73
2	Speziesvergleichende Mastzellinfiltration intestinaler Neoplasien	74
V	DISKUSSION	77
1	Morphologischer und molekularer Vergleich feliner und humaner intestinaler Karzinome	77
2	Vergleichende Studie zur Rolle interepithelialer Mastzellen im Verlauf der intestinalen Adenom-Karzinom-Sequenz	81
VI	SCHLUSSBEMERKUNG UND AUSBLICK	87
VII	ZUSAMMENFASSUNG	89
VIII	SUMMARY	91
IX	TABELLENVERZEICHNIS	93
X	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97
XI	QUELLENVERZEICHNIS	101

XII	PUBLIKATIONEN UND BEITRÄGE AUF WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNGEN	115
1	Publikationen in Fachzeitschriften mit Peer-Review-Verfahren.....	115
2	Beiträge auf wissenschaftlichen Tagungen	117
XIII	ANHANG	119
1	Materialien.....	119
1.1	Geräte	119
1.2	Software	120
1.3	Weitere Materialien.....	120
1.4	Histochemische Färbelösungen und Reagenzien für Paraffinschnitte	121
1.5	Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie	121
1.5.1	Primärantikörper	121
1.5.2	Sekundärantikörper	124
1.5.3	Negativkontrollen.....	124
1.5.4	Weitere Reagenzien für Immunhistochemie	125
1.5.5	Kommerzielle Kits	126
1.6	Reagenzien/Kits für DNA-Extraktion, PCR und Sanger-Sequenzierung	127
1.6.1	Primer	127
2	Methoden	128
2.1	Anfertigung histologischer Schnitte.....	128
2.2	Kohorten.....	128
2.3	Histochemische Färbungen	129
2.3.1	Hämatoxylin-Eosin	129
2.3.2	Toluidinblau	130
2.4	Immunhistochemie	130
2.4.1	Immunhistochemische Protokolle Leica Bond TM RX ^m	131
2.4.2	Immunhistochemische Protokolle Ventana BenchMark XT	139
2.4.3	Entwässerungsprotokoll	143
2.5	Digitalisierung der histologischen Schnitte	144
2.6	Histologische Auswertung	144
2.6.1	Klassifikation und Grading	144
2.6.2	WHO-Subtypisierung humaner und feliner kolorektaler Karzinome	146
2.6.3	Semiquantitatives Mastzell-Scoring.....	147
2.7	DNA-Extraktion, PCR und Sanger-Sequenzierung	148
3	Ergänzendes Material.....	151
3.1	Supplementary Material Publikation I	151
3.1.1	Graphical Abstract	153
3.1.2	Cover Story <i>Cancers</i> Volume 13 Issue 23, December (I) 2021	154
3.2	Supplementary Material Publikation II.....	156
XIV	DANKSAGUNG	163

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AK	Antikörper
ANOS	<i>engl.</i> Adenocarcinoma Not Otherwise Specified
AOM	Azoxymethan
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
Aqua dest	Aqua destillata
BCL10	<i>engl.</i> B-Cell Lymphoma 10
Bd	<i>engl.</i> Tumor Budding
BGMZ	Bindegewebsmastzellen
<i>BRAF</i>	Gen, eine Serin/Threonin-Proteinkinase (B-Raf) codierend
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
CARD	<i>engl.</i> Caspase Recruitment Domain
CBM	CARD/BCL10/MALT1
CC	<i>engl.</i> Cell Conditioning
CD34	<i>engl.</i> Cluster of Differentiation 34
CEP	<i>engl.</i> Comparative Experimental Pathology
CIMP	<i>engl.</i> CpG Island Methylator Phenotype
CIMP-H	<i>engl.</i> CIMP-high
CIN	<i>engl.</i> Chromosomal Instability/Chromosomeninstabilität
CP	Carboxypeptidase
CpG-Island	<i>engl.</i> Cytosine-phosphate-Guanine (5' → 3')/Cytosin-Guanin-Insel
CRC	<i>engl.</i> Colorectal Cancer
CS	Chondroitinsulfat
CTMC	<i>engl.</i> Connective Tissue Mast Cell
<i>CTNNB1</i>	Gen, β-Catenin codierend
d.h.	das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	<i>engl.</i> Deoxyribonucleic Acid/Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

DSS	<i>engl.</i> Dextran Sulfate Sodium/Dextran Natriumsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>engl.</i> Epidermal Growth Factor Receptor
ER	<i>engl.</i> Epitope Retrieval
et al.	et alii
evtl.	eventuell
Exo I	Exonuklease I
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fab	<i>engl.</i> Fragment antigen-binding/Antigen-bindendes Fragment
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis coli
FcεRI	Fc-Zellmembran-Rezeptor
FFPE	Formalin-Fixiert Paraffin-Eingebettet
FZD1	<i>engl.</i> Frizzled 1
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GEMM	Genetisch Modifizierte Mausmodell/e
GEMMs	<i>engl.</i> Genetically Engineered Mouse Models
GIN	Gastrointestinale Intraepitheliale Neoplasie
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase-3β
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>engl.</i> hours/Stunden
H1	Citrat-Vorbehandlung
H2	EDTA-Vorbehandlung
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HS	<i>engl.</i> High Sensitivity
HTX	Hämatoxylin
i.d.R.	in der Regel
IE	Intestinale Epithelzellen
ieMMCs	<i>engl.</i> interepithelial Mucosal Mast Cells
ieMMZ	interepitheliale Mukosale Mastzellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin

Inc.	<i>engl.</i> Incorporated
INHAND	International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria
IQA	Interquartilsabstand
IZ	Immunzellpopulation
Ki-67	Kiel-67 (Proliferationsmarker)
KO	<i>engl.</i> Knockout
<i>KRAS</i>	<i>engl.</i> Kirsten Rat Sarcoma Virus/Gen, ein G-Protein (K-Ras) codierend
KRK	Kolorektales Karzinom
L.	Lamina
LCS	<i>engl.</i> Liquid Cover Slip
Li ₂ CO ₃	Lithiumcarbonat
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
lpMMCs	<i>engl.</i> lamina proprial Mucosal Mast Cells
lpMMZ	Lamina propria-assozierte Mukosale Mastzellen
M	Molarität
MALT1	<i>engl.</i> Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation 1
MAPK	<i>engl.</i> Mitogen-Activated Protein Kinase
MC	<i>engl.</i> Mast Cell
MCPT	<i>engl.</i> Mast Cell Protease
min	Minuten
MIN	Multiple Intestinale Neoplasien
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MMC	<i>engl.</i> Mucosal Mast Cell
mMCP	<i>engl.</i> murine Mast Cell Protease
MMHCC	<i>engl.</i> Mouse Models of Human Cancer Consortium
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMR	<i>engl.</i> DNA Mismatch Repair/Mismatch-Reparatur-Proteine
MMZ	Mukosale (schleimhautassoziierte) Mastzelle
MSI	<i>engl.</i> Microsatellite Instability/Mikrosatelliteninstabilität
MZ	Mastzelle
MZ _c	Chymase-positive-Tryptase-negative Mastzelle
MZ _t	Tryptase-positive-Chymase-negative Mastzelle
MZ _{tc}	Tryptase-positive-Chymase-positive Mastzelle
MZC	Mastzell-Chymase
MZD	Mastzelldichte

MZT	Mastzell-Tryptase
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
OT	Objektträger
PAR-2	Protease-Aktivierter Rezeptor 2
PCR	<i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction/Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>engl.</i> Platelet Derived Growth Factor
PG	Proteoglykan
Primer-F	<i>engl.</i> Forward Primer
Primer-R	<i>engl.</i> Reverse Primer
rpm	<i>engl.</i> Revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAC	<i>engl.</i> Serrated Adenocarcinoma/Serratiertes Adenokarzinom
SAP	<i>engl.</i> Shrimp Alkaline Phosphatase
SCF	<i>engl.</i> Stem Cell Factor/Stammzellfaktor
sog.	sogenannt
STAT	<i>engl.</i> Signal Transducer and Activator of Transcription proteins
TCF/LEF	<i>engl.</i> T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor
TGF-β	<i>engl.</i> Transforming Growth Factor-beta
TME	<i>engl.</i> Tumor Microenvironment
TMM	Tumormikromilieu
TP53	Tumor Protein 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUM	Technische Universität München
u.a.	unter anderem
UK	<i>engl.</i> United Kingdom/Vereinigtes Königreich
USA	<i>engl.</i> United States of America/Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
v/v	Volumenprozent
VE Wasser	Vollentsalztes Wasser
VEGF	<i>engl.</i> Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	<i>engl.</i> World Health Organization/Weltgesundheitsorganisation

WT	Wildtyp
XYL	Xylol
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
β	beta

I EINLEITUNG

Die Rolle der Mastzelle bei Überempfindlichkeitsreaktionen ist hinreichend geklärt, während über ihre Rolle im Rahmen neoplastischer Erkrankungen bis heute Kontroversen bestehen (OLDFORD & MARSHALL, 2015). Obgleich bekannt ist, dass phänotypisch und funktional heterogene Mastzellpopulationen im Organismus existieren und insbesondere die Mastzellen des Intestinaltraktes sich von denen anderer Körpergewebe unterscheiden (GURISH & AUSTEN, 2012), konnte die Rolle der Mastzellen im Rahmen der intestinalen Karzinogenese bis dato nicht abschließend geklärt werden. Die Analyse des immunologischen Tumormikromilieus, in seiner Gesamtheit bestehend aus Gefäßen, Immunzellen, Stroma und Tumorzellen, wird mit Beginn der Ära der Immuntherapie jedoch zunehmend bedeutender (HODGES et al., 2012; OLDFORD & MARSHALL, 2015).

Das kolorektale Karzinom ist weltweit die dritthäufigste humane Krebserkrankung und der zweithäufigster Grund krebsbedingter Todesfälle (SUNG et al., 2021) mit bis zum Jahre 2030 geschätzt 2,2 Millionen Neuerkrankungen (ARNOLD et al., 2017) und somit eine Erkrankung von hoher sozioökonomischer Relevanz. Nach wie vor sind genetisch modifizierte Mausmodelle die am häufigsten angewandten Tiermodelle zur experimentellen Erforschung der humanen intestinalen Karzinogenese (JACKSTADT & SANSOM, 2016). Im Gegensatz zur hoch komplexen, heterogenen spontanen intestinalen Karzinogenese innerhalb des humanen und felines Organismus können mittels experimentell induzierter Neoplasien lediglich schrittweise einzelne molekulare Mechanismen und immunologische Eigenschaften untersucht werden (CHEON & ORSULIC, 2011). Sowohl die histomorphologische Architektur (WARD et al., 2022) als auch die Mastzellinfiltration intestinaler Neoplasien des Menschen können jedoch markante Differenzen zur Maus aufweisen. Obwohl ein und dieselbe Zellart, sind Mastzellen verschiedener Spezies stets genauso heterogen wie das speziesspezifische Immunsystem. Während diese in der Maus und dem Menschen zwar separat erforscht wurden, jedoch weniger oft direkt vergleichend (BISCHOFF, 2007), ist über die Mastzellheterogenität des felines Intestinaltraktes bis dato nur wenig bekannt.

Ziel dieser Studie war es, einen dezidierten Vergleich des Phänotyps der mukosalen Mastzellsubpopulationen im räumlichen Kontext intestinaler (Prä-)Neoplasien, d.h.

in Adenomen bzw. Karzinomen, von verschiedenen, in der biomedizinischen Forschung häufig angewandten, genetisch modifizierten Mausmodellen der intestinalen Karzinogenese mit spontanen humanen sowie feline Neoplasien anzustellen. Die deskriptive immunphänotypische Charakterisierung und topografische Kartierung von Mastzellsubpopulationen in intestinalen Adenomen und Karzinomen soll die Rolle dieser spezifischen Zellpopulation im Rahmen der intestinalen Karzinogenese speziesvergleichend präzisieren und somit einen positiven Beitrag zur komparativen pathoologischen Forschung sowie zur möglichen Erschließung neuer Therapieansätze bei Darmkrebs leisten.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Die Mastzelle

Bereits im Jahre 1878 entdeckte der Mediziner Paul Ehrlich die Mastzelle (MZ) im Rahmen der Forschung für seine Promotionsarbeit. Sie stach ihm durch die auffällige Anfärbung ihrer zytoplasmatischen Granula ins Auge. Da er sie erstmals bei wohlgenährten, gemästeten Tieren entdeckte, nannte er sie „Mastzelle“ (EHRlich, 1878). Seit nun über 140 Jahren wird an MZ und ihrer fortwährend komplexer erscheinenden, facettenreichen Rolle im Immunsystem in Zusammenhang mit allergischen, entzündlichen, autoimmunen, parasitären und neoplastischen Erkrankungen geforscht.

Mastzellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Bevor sie in den Blutkreislauf übergehen, differenzieren sie partiell aus und gelangen als zirkulierende CD34⁺ Vorläuferzellen anschließend zu ihren Wirkorten in der Körperperipherie, wo sie sodann final ausdifferenzieren (SCHWARTZ, 2001; FROSSI et al., 2018). Physiologischerweise sind MZ am häufigsten in Haut, Darm, Lunge sowie der nasalen, pharyngealen und konjunktivalen Mukosa lokalisiert (IRANI & SCHWARTZ, 1994). Außerdem akkumulieren MZ in pathologisch veränderten Geweben, denen eine primär entzündliche (FROSSI et al., 2019), autoimmune (BOECKXSTAENS, 2015), allergische (MENZIES-GOW et al., 2004), parasitäre (VOGEL et al., 2018) oder neoplastische (FLORES DE LOS RIOS et al., 2020) Genese zugrunde liegt.

Mastzellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und interagieren zudem mit Zellen des adaptiven Immunsystems, v.a. T- und B-Zellen (ALBERT-BAYO et al., 2019). Ihre Rolle bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ I (IgE-vermittelte Allergie vom Soforttyp, Anaphylaxie) ist bekannt. Hierbei wird unmittelbar durch die Bindung von IgE an IgE-bindende Fc-Zellmembran-Rezeptoren (FcεRI) eine mastzelluläre Degranulation ausgelöst. Diese führt u.a. zur Änderung von Gefäßtonus und -permeabilität (z.B. durch Histamin), zu Motilitätsänderungen bzw. Spasmen der glatten Muskulatur, zur chemotaktischen Anziehung weiterer Immunzellen (z.B. durch Interleukine (IL)), zu Gewebeumbau sowie zu Gerinnungsstörungen (z.B. durch Heparin) (BISCHOFF, 2007).

Weiterhin fungieren MZ im Rahmen der Abwehr von Bakterien, Parasiten und toxischen Substanzen als Wächterzellen an mukosalen Oberflächen und wirken sowohl direkt antimikrobiell (z.B. durch Abgabe von MZ-Proteasen) als auch immunantwortverstärkend (pro-immunogen) (DUDECK et al., 2019).

Seit langem ist bekannt, dass MZ eine wandelbare und heterogene Zellpopulation darstellen (HARDY & WESBROOK, 1895; ENERBÄCK, 1986). Auf dieser Basis wurden in Maus und Mensch MZ-Subpopulationen klassifiziert (ENERBÄCK, 1966a; WEIDNER & AUSTEN, 1993). Im Intestinaltrakt findet sich eine der größten Mastzellpopulationen des Körpers (IRANI & SCHWARTZ, 1994). Im Kontext intestinaler Parasitosen der Maus wurde das vermehrte Auftreten einer speziellen Mastzellsubpopulation, der intra- oder interepithelialen MZ, beschrieben (SCUDAMORE et al., 1997; VOGEL et al., 2018). Gounaris et al. (2007) fanden dieselbe Subpopulation in intestinalen Adenomen transgener Mausmodelle und nannten sie *intraepithelial mast cells* (GOUNARIS et al., 2007).

1.1 Mastzellnomenklatur

Die MZ-Nomenklatur variiert zwischen Nager und Mensch. Im murinen¹ Intestinum wird historisch am häufigsten die folgende, topografisch sowie an Fixations- und Färbeeigenschaften orientierte, dichotome Klassifikation angewandt:

- Bindegewebsmastzellen (BGMZ) (*Connective Tissue Mast Cells* (CTMCs)), welche in der Submukosa und der Tunica muscularis lokalisiert sind und Tryptasen, Chymasen sowie Carboxypeptidase A, Heparin und v.a. Histamin enthalten (ENERBÄCK, 1966a; WELLE, 1997; PEJLER et al., 2007).
- Schleimhautassoziierte bzw. mukosale MZ (MMZ) (*Mucosal Mast Cells* (MMCs)), welche in der Tunica mucosa lokalisiert sind und vorwiegend Chymasen enthalten (ENERBÄCK, 1966a; WELLE, 1997; PEJLER et al., 2007).

Im Menschen werden demgegenüber generell gemäß immunphänotypischer Granulaausstattung die folgenden MZ-Subpopulationen definiert:

- Tryptase-positive-Chymase-negative (MZ_T)

¹ Der Begriff „murin“ meint in dieser Arbeit „die Maus betreffend“.

- Tryptase-positive-Chymase-positive (MZ_{TC})
- Chymase-positive-Tryptase-negative (MZ_C)

Mastzellen (WEIDNER & AUSTEN, 1993; SCHWARTZ, 1994; PEJLER et al., 2007).

Während in der humanen intestinalen Mukosa MZ_T dominieren, herrschen MZ_{TC} in der intestinalen Submukosa vor (IRANI et al., 1986; WEIDNER & AUSTEN, 1993). MZ_C wurden bis heute nur selten mittels Immunfluoreszenz als isolierter Subtyp identifiziert (WEIDNER & AUSTEN, 1993), sie werden deshalb in der Literatur zumeist nicht aufgeführt (WELLE, 1997). Überwiegend wird die humane MZ-Nomenklatur auch im kaninen und felinen Kontext angewandt (KUBE et al., 1998; NOVIANA et al., 2001).

1.2 (Immun-)Histologische Charakteristika der intestinalen Mastzelle

Um die mastzelluläre Rolle bei physiologischen sowie pathologischen immunologischen Vorgängen des Intestinaltraktes erforschen zu können, ist die Kenntnis (immun-)histologischer Charakteristika der intestinalen MZ, v.a. während der präanalytischen, analytischen und postanalytischen Phase der Immunhistochemie (IHC) (RAMOS-VARA & MILLER, 2014), essenziell. Denn nach initialer, standardmäßiger Formalinfixierung (d.h. in gesättigter, wässriger, i.d.R. 10%iger Lösung aus Formaldehyd 4 % (v/v), neutral gepuffert) des Gewebes lassen sich intestinale MMZ histochemisch (z.B. mittels Toluidinblau (TB)) nicht mehr zuverlässig identifizieren (ENERBÄCK, 1966a, 1966b). Dementgegen sind sie gut färbbar, wenn sie zuvor mit Carnoy'scher Fixierlösung (bestehend aus Ethanol, Chloroform und Eisessig) oder Bleiacetat fixiert wurden (ENERBÄCK, 1966a). Die Azidität der Carnoy'schen Fixierlösung vereinfacht ionische Wechselwirkungen zwischen den Glykosaminoglykanen (GAG) der MZ-Granula und basischen, kationischen Färbelösungen (UVNÄS et al., 1970; STROBEL et al., 1981). Von Paul Ehrlich eingeführt, beschreibt die „Metachromasie“ die Charakteristik der MZ, sich in einem anderen Farbton als jenem des verwendeten Färbemittels anzufärben (d.h. mit TB eine rote bis violette Anfärbung der MZ-Granula). Bald darauffolgend fanden Holmgren und Wilander (1937) heraus, dass in erster Linie das Heparin, ein GAG, für die mastzelluläre Eigenschaft der Metachromasie verantwortlich ist (HOLMGREN &

WILANDER, 1937; RIBATTI, 2018). Dementsprechend trägt das fehlende Heparin in murinen MMZ (siehe Tabelle 1) zu deren unzureichender histochemischer Darstellbarkeit nach Formalinfixierung bei (WELLE, 1997).

Eine immunhistochemische Detektion von MZ-spezifischen Antigenen ist durch hitzetechnische oder enzymatische Vorbehandlung der Gewebsschnitte und der damit verbundenen Antigendemaskierung jedoch auch nach standardmäßiger Gewebefixierung in Formalin möglich (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Monoklonale Primärantikörper sind ausreichend sensitiv, um auch noch kleinste Mengen an MZ-spezifischen Proteasen detektieren zu können, selbst dann, wenn die MZ sich in einem degranulierten Stadium befindet (ANFENSEN et al., 2014) oder das intestinale Gewebe teils unzureichend fixiert ist (VOGEL et al., 2018).

Des Weiteren ist eine unspezifische immunhistochemische Positivität der MZ in Mensch, Maus und Katze beschrieben (RUCK et al., 1990; SCHILTZ et al., 1993; HARLEY et al., 2002). Da eine Bindung des antigenbindenden Antikörper-Fragments (Fab) an Heparin als ursächlich für die unspezifische immunhistochemische Positivität von MZ identifiziert wurde (SCHILTZ et al., 1993), sind lediglich MZ, die Heparin enthalten immunhistologisch unspezifisch positiv. Eine Präinkubation des Objektträgers mit Heparinase oder des Antikörpers (AK) mit Heparin führt zur Elimination unspezifischer AK-MZ-Bindung. Das Mitführen geeigneter immunhistologischer Positiv- sowie Negativkontrollen ist daher im Rahmen MZ-untersuchender Studien, welche sich immunhistochemischer Methoden bedienen, essenziell (HARLEY et al., 2002; RAMOS-VARA & MILLER, 2014).

1.3 Mastzellgranula

Ihre immunologischen Effekte üben MZ mittels Ausschüttung ihrer Granula (Degranulation) bzw. bestimmter Botenstoffe, welche sich in ihrem Zytoplasma befinden, aus. Mastzellgranula bestehen aus präformierten, gespeicherten Mediatoren (u.a. Histamin, Proteasen, Proteoglykane (PG), Zytokine) (PEJLER et al., 2010). Andere effektive Botenstoffe werden nach MZ-Aktivierung *de novo* synthetisiert (u.a. Wachstumsfaktoren oder Zytokine wie IL) (METCALFE et al., 1997; KALESNIKOFF & GALLI, 2008; RÖNNBERG et al., 2012).

Das mastzelluläre PG Serglycin, mit seinen variablen GAG-Seitenketten (Heparin bzw. Chondroitinsulfate (CS)), fungiert als essenzielle Trägerstruktur für Proteasen

(z.B. Tryptase) und biogene Amine (z.B. Histamin) und beeinflusst deren enzymatische bzw. biologische Eigenschaften auch nach Freisetzung aus der Mastzelle (RÖNNBERG et al., 2012; MULLOY et al., 2017). Das MZ-populationsspezifische, dynamische GAG- und Proteasenprofil, sowie ein variables Set an Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, erklärt u.a. die Involvierung von MZ in eine Vielzahl höchst diverser immunologischer Prozesse. Dabei ist die MZ eine Zelle von höchster Plastizität (DA SILVA et al., 2014). Das gewebespezifische Mikromilieu beeinflusst die MZ-Differenzierung. In Abhängigkeit von milieuspezifischen Anforderungen ändern murine MMZ bspw. im Verlauf einer intestinalen Infektion mit *Trichinella spiralis* ihr granuläres Proteasenprofil reversibel, und in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation innerhalb der intestinalen Mukosa, hin zu einem Mastzell-Chymase (MZC) dominierten ieMMZ-Phänotyp (FRIEND et al., 1996; FROSSI et al., 2018).

Tabelle 1 fasst ausgewählte granuläre Eigenschaften der murinen MZ-Subtypen (MMZ und BGMZ) zusammen, Tabelle 2 jene der humanen Subtypen (MZ_C, MZ_T und MZ_{TC}).

Tabelle 1 | Ausgewählte granuläre Eigenschaften der Mastzellsubtypen der Maus. Modifiziert nach Schwartz (1994) und Welle (1997) (SCHWARTZ, 1994; WELLE, 1997).

	MMZ	BGMZ	Referenzen
Proteasen			
Chymasen	mMCP-1, mMCP-2 (β -Chymasen)	mMCP-4 (β -Chymase), mMCP-5 (α -Chymase)	(SCHWARTZ, 1994) (PEJLER et al., 2007)
Tryptasen	-	mMCP-6, mMCP-7	
Carboxypeptidase	-	Carboxypeptidase A	
Biogene Amine			
Histamin	+	+	(SCHWARTZ, 1994)
Serotonin	-	+	
Proteoglykan-Seitenketten			
Heparin	-	+	(SCHWARTZ, 1994)
Chondroitinsulfat (CS)	CS E	-	
MMZ: Mukosale Mastzelle; BGMZ: Bindegewebsmastzelle; mMCP: murine Mast Cell Protease; - nicht enthalten; + enthalten			

Tabelle 2 | Ausgewählte granuläre Eigenschaften der Mastzellsubtypen des Menschen. Modifiziert nach Irani & Schwartz (1994) und Welle (1997) (IRANI & SCHWARTZ, 1994; WELLE, 1997).

	MZ _C	MZ _T	MZ _{TC}	Referenzen
Proteasen				
Chymasen	Chymase 1	(+)	Chymase 1	(WEIDNER & AUSTEN, 1993) (IRANI & SCHWARTZ, 1994) (PEJLER et al., 2010)
Tryptasen	(+)	α , β (I-III)	α , β (I-III)	
Carboxypeptidase	+	-	+	
Cathepsin G	?	-	+	
Biogene Amine				
Histamin	?	+	+	(IRANI & SCHWARTZ, 1994)
Proteoglykan-Seitenketten				
Heparin	?	+	+	(IRANI & SCHWARTZ, 1994)
Chondroitinsulfat (CS)	?	CS A, E	CS A, E	
MZ _C : Chymase-positive-Tryptase-negative Mastzelle; MZ _T : Tryptase-positive-Chymase-negative Mastzelle; MZ _{TC} : Tryptase-positive-Chymase-positive Mastzelle; - nicht enthalten; + enthalten; (+) selten und relativ geringfügig enthalten; ? fraglich				

1.3.1 Tumorassoziierte funktionelle Aspekte mastzellärer Proteasen

Mastzelläre Proteasen beeinflussen die Tumorangiogenese (COUSSENS et al., 1999; MAURO et al., 2008; DE SOUZA et al., 2012), den physiologisch geordneten Epithelzellverband der intestinalen Mukosa (ALBERT-BAYO et al., 2019) sowie das Tumorwachstum (RIBATTI & CRIVELLATO, 2012). Im Folgenden sollen insbesondere bereits bekannte, funktionell regulierende Aspekte der beiden MZ-spezifischen Proteasen Tryptase (MZT) und Chymase (MZC) dargestellt werden.

Das Enzym MZT aktiviert nach seiner Freisetzung den Protease-aktivierten Rezeptor 2 (PAR-2) (COMPTON et al., 2001), der sowohl auf Endothel- als auch auf intestinalen Epithelzellen exprimiert wird (BUENO & FIORAMONTI, 2008; MARECH et al., 2014). Mittels einer deskriptiven immunhistochemischen Studie visualisierten Malfettone et al. (2013) einen positiven Zusammenhang zwischen einem erhöhten Vorkommen von MZT und epithelialer PAR-2 Expression humaner Kolonkarzinomzellen (MALFETTONE et al., 2013). Bereits frühere Studien haben gezeigt, dass die MZT über PAR-2-vermittelte Aktivierung des MAPK-Signalweges einen proliferationsfördernden Einfluss auf Kolonkarzinomzellen ausübt (JIKUHARA et al., 2003; YOSHII et al., 2005). Darüber hinaus ist eine direkt epithelschädigende Wirkung (bei hohen MZT-Konzentrationen, *in vitro*) beschrieben (LI et al., 2015). Die Ausschüttung von MZT kann weiterhin direkt (an Endothelzellen) (BLAIR et al., 1997; DE SOUZA et al., 2012) oder indirekt (z.B. durch Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) oder Aktivierung von Fibroblasten im Rahmen von Neovaskularisation) (COUSSENS et al., 1999) pro-angiogen wirken (DE SOUZA et al., 2015).

Auch die MZC wirkt pro-angiogen, jedoch erscheint diese Wirkung weniger effektiv als jene der MZT (COUSSENS et al., 1999; DE SOUZA et al., 2015). Zudem hat die MZC proliferationsregulierende und matrixmodellierende Effekte. Durch Aktivierung von MMP-9 beeinflusst sie den Ab- und Umbau der EZM indirekt (FANG et al., 1996; COUSSENS et al., 1999). Jiang et al. (2017) bestätigten dies, indem sie zeigten, dass aktive MZC in Lungenkarzinomzelllinien *in vitro* die MMP-9 Expression verstärkt und deren Freisetzung fördert. Zusätzlich bewirkt die MZC durch Spaltung von E-Cadherin den Verlust von Zell-Zelladhäsionen und begünstigt folglich Tumorzellablösung bzw. Metastasierung (JIANG et al., 2017). Insbesondere der MZC werden pro-immunogene Effekte bzw. die Rekrutierung von

neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, von Lymphozyten und Makrophagen zugeschrieben (HE & WALLS, 1998).

1.3.2 Schleimhautassoziierte Mastzellsubtypen

Da sich die mastzelluläre Proteasenexpression in Abhängigkeit des pathophysiologischen Immunmilieus dynamisch verändern kann, ist eine reine Klassifizierung des MZ-Phänotyps gemäß Proteasengehalt, wie sie bei humanen MZ standardmäßig angewandt wird, mehr als ein plastischer, denn als ein final ausdifferenzierter Zustand zu interpretieren (ALBERT-BAYO et al., 2019).

Lange waren im murinen Organismus nur 2 Gruppen von MZ bekannt. Lennart Enerbäck definierte in Nagern gemäß ihrer topografischen Lage BGMZ und MMZ, welche sich auch durch ihre Färbe- und Fixierungseigenschaften unterschieden (ENERBÄCK, 1966b, 1966a). In einer aktuellen Studie von Vogel et al. (2018), in welcher das Vorkommen von MZ im Darm nematodeninfizierter versus uninfizierter Mäuse untersucht wurde, wird diese dichotome Klassifikation auf immunhistochemischer Basis um 2 MMZ-Subpopulationen erweitert:

- Interepitheliale (zwischen den Epithelzellen liegende) mukosale MZ (ieMMZ) (*interepithelial Mucosal Mast Cells*, ieMMCs), vormals auch *Globule Leukocytes* (GLs), positiv für murine Mastzellprotease-1 (mMCP-1/MCPT1)
- Lamina propria-assoziierte mukosale MZ (lpMMZ) (*lamina proprial Mucosal Mast Cells*, lpMMCs), positiv für murine Mastzellprotease-4 (mMCP-4/MCPT4)

(VOGEL et al., 2018) (Abbildung 1).

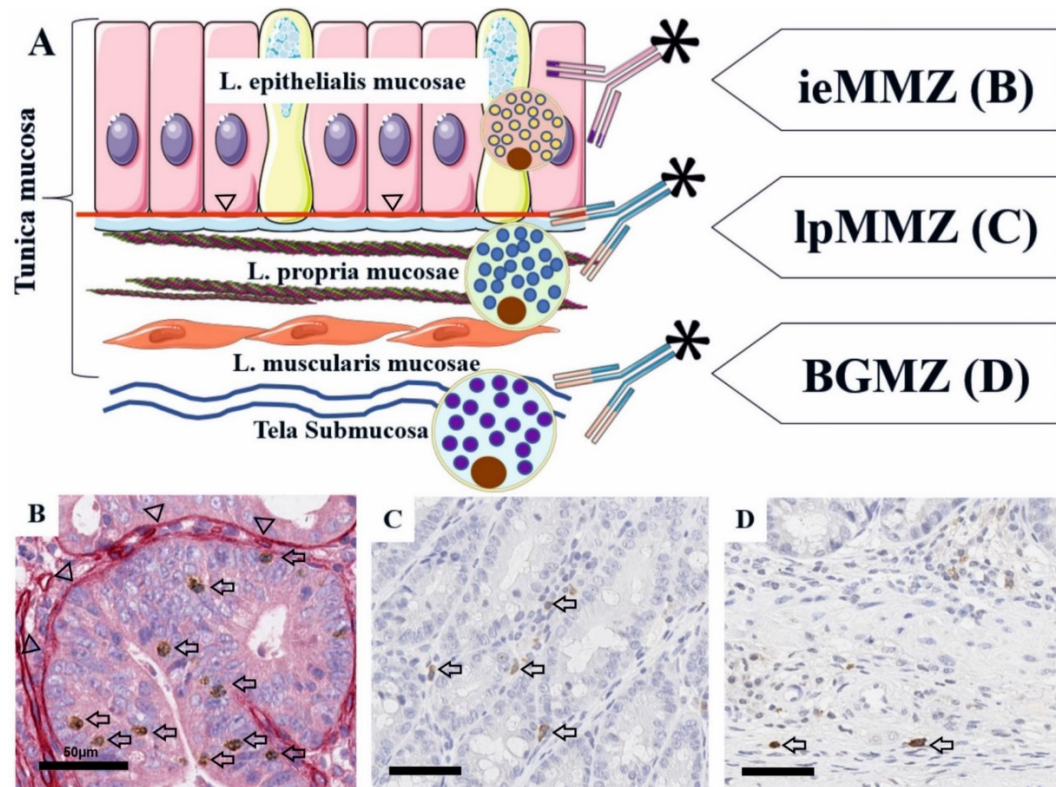


Abbildung 1 | (A) Schematische und (B-D) korrespondierende histologische Darstellung intestinaler Mastzellsubtypen der Maus. *Proof of principle* des immunhistochemischen Algorithmus nach Vogel et al. (2018) (VOGEL et al., 2018). (B) In der Lamina (L.) epithelialis mucosae lokalisierte, runde interepitheliale mukosale Mastzellen (ieMMZ). Die epitheliale Lage oberhalb der Basalmembran wird mittels einer immunhistochemischen Doppelreaktion für Kollagen IV (Basallamina, rotes Chromogen, Pfeilspitzen) und Mastzellprotease-1 (MCPT1) (ieMMZ, braunes Chromogen, Pfeile) gezeigt. (C) In der Lamina propria mucosae lokalisierte, meist elongierte, mukosale Mastzellen (lpMMZ), dargestellt mittels Mastzellprotease-4 (MCPT4) Immunhistochemie (Pfeile). (D) In der Tela Submucosa und im darunterliegenden Bindegewebe lokalisierte, größere Bindegewebsmastzellen (BGMZ), positiv für MCPT4 (Pfeile). Schema (A) modifiziert nach Servier Medical Art, zur Verfügung gestellt durch Servier, lizenziert durch eine unportierte Creative Commons Attribution 3.0 Lizenz (SERVIER, o.J.) (abgerufen am 04.06.2020).

Während ieMMZ mit MCPT1-AK immunhistochemisch detektiert werden, können lpMMZ und BGMZ mittels MCPT4 visualisiert werden. LpMMZ können nach initialer Formalinfixierung des zu untersuchenden Gewebes histochemisch (z.B. mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)) nicht spezifisch angefärbt werden, während ieMMZ

deutlich eosinophil granuliert erscheinen. Die Autoren² plädieren für die standardmäßige Applikation immunhistochemischer Methoden, um die o.g. MZ-Subpopulationen zukünftig stringent zu klassifizieren. Die von Vogel et al. (2018) beschriebenen ieMMZ, als dritter intestinaler muriner MZ-Subtyp, wurden in vorherigen Studien häufig als GLs, jedoch nicht als MZ, identifiziert (VOGEL et al., 2018).

Obwohl GLs bereits vor über 100 Jahren als „Schollenleukozyten“ erstmalig (WEILL, 1919), und bis heute in einer großen Variation von Spezies und Organen (KENT, 1952, 1966; TAKEUCHI et al., 1969; TONER & FERGUSON, 1971; ESTEVES et al., 2000; VAN MEULDER et al., 2013; OHFUJI, 2020), beschrieben wurden, wird weiterhin kontrovers über deren Ursprung und Funktion diskutiert. Ohfuji et al. (2020) beschrieben histologisch die Entwicklung von GLs aus MZ im Rinderpansen (OHFUJI, 2020). Speziesübergreifend wurde zudem ein lymphozytärer (ESTEVES et al., 2000), plasmazellulärer, eosinophiler oder mesenchymaler Ursprung der GLs diskutiert (HONOR et al., 1986). Aktuell wird von Vogel et al. (2018), wie schon zuvor von Huntley et al. (1992), in Nagern die Abstammung von GLs aus MZ-Vorläuferzellen befürwortet (HUNTLEY, 1992), GLs also als eine Art ausdifferenzierter MZ-Subtyp charakterisiert und somit ieMMZ genannt (VOGEL et al., 2018).

Das Vorkommen und die immunologische Rolle von ieMMZ bzw. GLs ist in Hinblick auf parasitäre Infektionen bis dato vielfach untersucht worden (SCUDAMORE et al., 1997; VAN MEULDER et al., 2013; VOGEL et al., 2018). Vogel et al. (2018) vermuten eine immunmodulierende Funktion der ieMMZ, die den mukosalen Schaden bei einer intestinalen Parasitose möglicherweise reduziert (VOGEL et al., 2018).

Über die konkrete Rolle der ieMMZ-Subpopulation im Rahmen der murinen intestinalen Karzinogenese ist wenig bekannt (GOUNARIS et al., 2007; SAADALLA et al., 2018). Eine Beschreibung von ieMMZ im felines und humanen Darm erfolgte bis dato nicht konkret und nicht auf immunhistochemischer Ebene (TAKEUCHI et al., 1969; ALVES et al., 2016), eine nähere Untersuchung in Zusammenhang mit der intestinalen Karzinogenese blieb aus.

² Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

1.4 Die Rolle der Mastzelle im intestinalen Tumormikromilieu

Während der Karzinogenese trägt ein komplexes, interaktives Netzwerk aus Tumorzellen und nichtneoplastischen, reaktiven Zellen (z.B. Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen) zu einem tumorumgebenden Nischenmilieu bei, welches eng mit der Entstehung und Progression des Tumors verzahnt ist. Dieses dynamische zelluläre Netzwerk wird als Tumormikromilieu (TMM) (*tumor microenvironment*; TME) bezeichnet (SEGURA-VILLALOBOS et al., 2022). Es beeinflusst direkt (bidirektionale Zell-Tumorzell-Interaktion) und indirekt (multidirektionale Zell-Interaktionen zwischen: anderen Immunzellen; Zellen des Tumorstromas; Endothelzellen; der EZM) die Karzinogenese (HUI & CHEN, 2015).

Mastzellen sind unter den ersten Immunzellen, die in humanen neoplastischen Läsionen (unabhängig von ihrer Genese) akkumulieren. Diese Erkenntnis wurde schon früh nach Erstbeschreibung der MZ durch Paul Ehrlich erlangt (WESTPHAL, 1891). In den darauffolgenden Jahren bestätigten dies zahlreiche Studien. Im Bereich der Krebsforschung wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um mögliche prognostische Zusammenhänge zwischen tumorassoziierter Mastzellendichte (MZD) und Überlebensdauer von Kolonkarzinompatienten zu identifizieren. Ob eine hohe MZD mit einer positiven oder negativen Prognose korreliert, bleibt jedoch bis heute Gegenstand kontroverser Diskussion (APONTE-LÓPEZ & MUÑOZ-CRUZ, 2020). Hierauf wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

In einer groß angelegten retrospektiven Studie von Mao et al. (2018) mit über 800 Patienten wurde die MZD (MZ_T) als ein unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert. Eine geringe MZD war mit einer stärkeren Immunantwort und besseren Überlebensrate korreliert als eine hohe MZD (MAO et al., 2018). Gleiches belegten Gulubova et al. (2009), indem sie zeigten, dass eine signifikante positive Korrelation zwischen MZD (MZ_T) und Mikrogefäßdichte in der invasiven Front kolorektaler Karzinome bestand (pro-angiogen) (GULUBOVA & VLAYKOVA, 2009). Flores de los Rios et al. (2020) untersuchten MZ-Populationen (MZ_T, MZ_C) in der peritumoralen Zone intestinaler metastatischer und nichtmetastatischer Primärtumore und berichten von einer stärkeren MZ-Degranulation in metastasierenden Kolonkarzinomen (pro-metastatisch) (FLORES DE LOS RIOS et al., 2020). Übereinstimmend zeigten Wang et al. (2016), dass eine hohe intratumorale MZD (MZ_T) mit Tumorprogression und Fernmetastasen vergesellschaftet ist (WANG et al.,

2016). Demgegenüber belegen andere Studien einen positiven Effekt von hoher MZD auf die Überlebenszeit von Kolonkarzinompatienten (anti-tumorigen) (TAN et al., 2005; MEHDAWI et al., 2016). Die Mehrheit durchgeführter Studien spricht jedoch für einen negativ prognostischen Effekt hoher MZD (pro-tumorigen) (MARECH et al., 2014; APONTE-LÓPEZ & MUÑOZ-CRUZ, 2020). Übereinstimmend wird eine hohe MZD in Verbindung mit besonders malignen, entdifferenzierten humanen Kolonkarzinomen gebracht (MALFETTONE et al., 2013; WANG et al., 2016).

Ebenso kann in intestinalen Neoplasien des murinen Darms eine erhöhte MZD festgestellt werden (GOUNARIS et al., 2007; SAADALLA et al., 2018). Gounaris et al. (2007) zeigen u.a., dass Adenome in MZ-depletierten Mäusen in Remission gingen und schlussfolgern daraus, dass MZ zur Entstehung und Progression intestinaler Adenome beitragen (GOUNARIS et al., 2007).

Die empirischen Befunde sprechen also dafür, dass MZ als Teil des intestinalen TMM Einfluss auf die Entstehung und Progression von Darmkarzinomen im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz nehmen. Dieser Einfluss kann potenziell sowohl direkt (Tumorzellen) (YU et al., 2018; SEGURA-VILLALOBOS et al., 2022), als auch indirekt (TMM) (COUSSENS et al., 1999; RIBATTI & CRIVELLATO, 2012; KOMI & REDEGELD, 2020) erfolgen.

Trotz hinreichender Evidenz für die Einflussnahme der MZ auf die Tumorgenese gibt es bis heute nur eine überschaubare Anzahl an Studien, die sich dezidiert der Erforschung der direkten interzellulären Kommunikation zwischen MZ und Krebszelle widmen. In der Vergangenheit wurden MZ, anders als z.B. Lymphozyten oder Makrophagen, in der immunonkologischen Forschung eher untergeordnet behandelt (APONTE-LÓPEZ & MUÑOZ-CRUZ, 2020). Und das obwohl v.a. die indirekten, pro-angiogenen Effekte der MZ innerhalb des TMM vielfach beleuchtet wurden und bereits erste konkrete, adjuvante Therapieansätze, bspw. die Blockierung der MZT und damit Stopp der PAR-2-Aktivierung durch Tryptaseinhibitoren, bieten (MARECH et al., 2014; RIBATTI, 2016).

Im Folgenden soll zunächst auf den aktuellen Kenntnisstand zur Rolle der MZ innerhalb des TMM, anschließend auf jenen zur direkten MZ-Tumorzell-Interaktion eingegangen werden.

MZ treten im TMM als funktionell wandelbare Akteure auf, die pro- aber auch anti-tumorigene Effekte haben können (MARICHAL et al., 2013; WANG et al., 2016).

Einerseits wird die biologische Funktion der MZ im TMM in einigen (prä-)klinischen Studien als pro-angiogen und pro-tumorigen beschrieben (GULUBOVA & VLAYKOVA, 2009; DE SOUZA et al., 2012; AMMENDOLA et al., 2016). Pro-angiogene MZ-Effekte treiben die nötige vaskuläre Versorgung des Tumors durch die Unterstützung der Neubildung von Gefäßen (Neovaskularisation) im Tumorstroma an und fördern somit die Tumorprogression. Mastzellulär sezernierte, pro-angiogene Biomoleküle sind bspw. Histamin (SÖRBO et al., 1994), Heparin (RIBATTI et al., 1987) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (GRÜTZKAU et al., 1998; RIBATTI & CRIVELLATO, 2012). Bezüglich der pro-angiogenen sowie pro-invasiven, matrixmodellierenden Mechanismen mastzellulärer Proteasen sei an dieser Stelle auf Kapitel II.1.3.1 verwiesen.

Andererseits werden der MZ im TMM insbesondere durch die Rekrutierung von Immunzellen (indirekte) anti-tumorigene Eigenschaften zugeschrieben (pro-immunogen). So postulieren Tan et al. (2005), dass MZ durch ihre Proteasenausstattung zur Verstärkung der lokalen Immunantwort, insbesondere tumorassoziierter Makrophagen, und somit zu einer verstärkten anti-tumorigenen Immunaktivität beitragen, was zu einer längeren postoperativen Überlebenszeit führte (TAN et al., 2005). Weitere pro-immunogene Botenstoffe sind u.a. verschiedene Interleukine, wobei in dieser Arbeit lediglich auf das Typ-2-Zytokin IL-5 eingegangen wird. Im Kontext onkologischer Erkrankungen zeigte eine frühere Studie, dass durch die Freisetzung von IL-5 aus MZ eosinophile Granulozyten aktiviert werden, welche zytotoxisch eine Tumorregression in Mäusen bewirkten (anti-tumorigen) (SIMSON et al., 2007). Andere Studien schlossen wiederum auf eine pro-angiogene Wirkung der IL-5 vermittelten Aktivierung von eosinophilen Granulozyten durch eosinophile VEGF-Freisetzung (pro-tumorigen) (HORIUCHI & WELLER, 1997; GALDIERO et al., 2017). Die Interaktion zwischen MZ und eosinophilen Granulozyten ist also bi- bzw. (unter Einbeziehung der weiteren TMM-assoziierten Immun- und Tumorzellen) multidirektional sowie multifunktional.

Zudem ist bekannt, dass der Phänotyp der MZ durch das umgebende Gewebsumilieu beeinflusst wird und somit mehr als dynamischer, denn als statischer Zustand betrachtet werden sollte (FRIEND et al., 1996; GURISH & AUSTEN, 2012; FROSSI et al., 2018). Auch die Rolle der MZ im TMM erscheint bislang komplex und hochdynamisch. Eine ausführlichere, dennoch stark vereinfachte, grafische Übersicht

mastzellärer biomolekularer Botenstoffe im Tumorkontext und deren Wirkung bietet Abbildung 2.

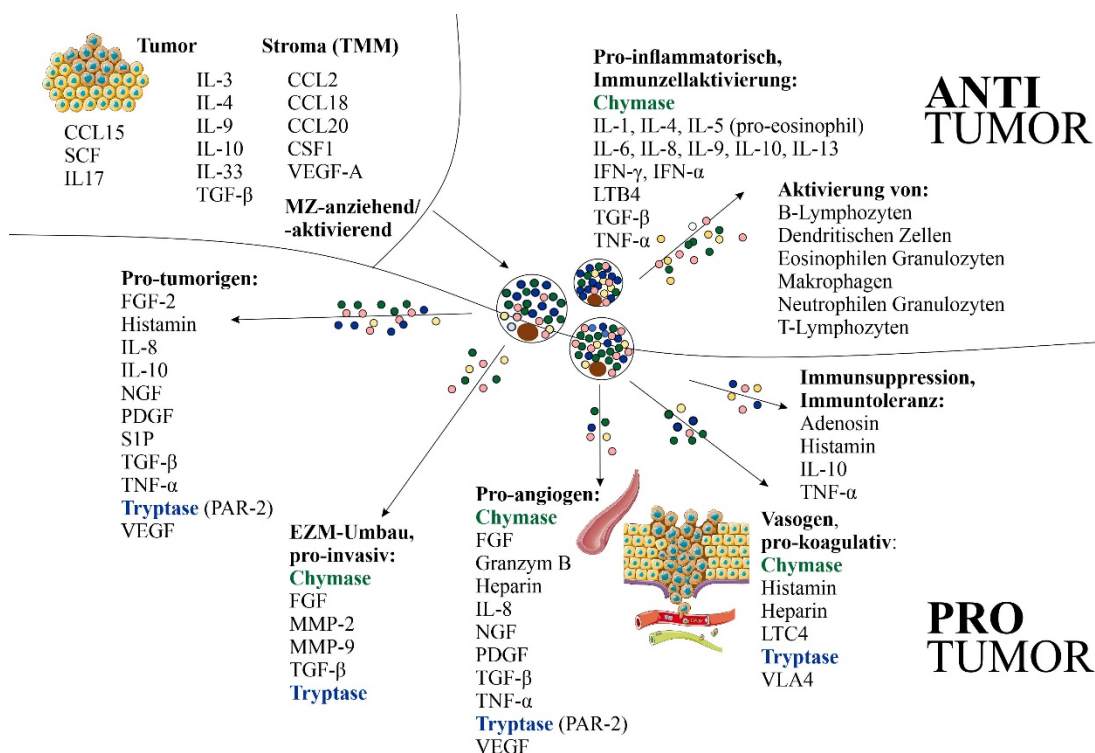


Abbildung 2 | Grafische Übersicht anti- und pro-tumorigener Mastzellfunktionen innerhalb des Tumormikromilieus (BISCHOFF, 2007; RIBATTI & CRIVELLATO, 2012; DE SOUZA et al., 2015; OLDFORD & MARSHALL, 2015; MUKAI et al., 2018; DUDECK et al., 2019; KOMI & REDEGELD, 2020). CCL: CC-Chemokin Ligand; CSF1: (Macrophage) Colony-Stimulating Factor 1; EZM: Extrazelluläre Matrix; FGF: Fibroblast Growth Factor; IL: Interleukin; INF: Interferon; LTB4/C4: Leukotrien B4/C4; MZ: Mastzelle; MMP: Matrix-Metalloprotease; NGF: Nerve Growth Factor; PAR-2: Protease-aktivierter Rezeptor 2; PDGF: Platelet-Derived Growth Factor; S1P: Sphingosin-1-Phosphat; SCF: Stem Cell Factor; TGF- β : Transforming Growth Factor beta; TMM: Tumormikromilieu; TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; VLA-4: Very Late Antigen-4 (Integrin α 4 β 1). Tumorzell- und Gefäßabbildungen von Servier Medical Art, zur Verfügung gestellt durch Servier, lizenziert durch eine unportierte Creative Commons Attribution 3.0 Lizenz (SERVIER, o.J.) (abgerufen am 11.04.2022).

1.4.1 Mastzell-Tumorzell-Interaktion

Die Untersuchung der direkten MZ-Tumorzell-Interaktion ist Gegenstand aktueller Forschung. Tumorzellen können MZ aktiv chemotaktisch in das TMM locken (z.B. mittels Stammzellsfaktor (SCF)) (HUANG et al., 2008; YU et al., 2018; SEGURA-VILLALOBOS et al., 2022).

Generell ist die Immunzell-Tumorzell-Interaktion ein komplexer, dynamischer und reziprok beeinflusster Prozess (sog. *Cancer Immunoediting*), der aus 3 Stufen besteht (SEGURA-VILLALOBOS et al., 2022): Im Rahmen des Immunoeditings, bestehend aus *Elimination*, *Equilibrium*, *Escape* („3 E“), erkennen Immunzellen zunächst körperfremde Tumorzellen, rekrutieren weitere Immunzellen und attackieren die Tumorzellen (*Elimination*). Im nächsten Schritt werden besonders resistente Tumorzellen selektiert (*Equilibrium*), welche Mechanismen entwickelt haben, um der Immunantwort zu entkommen (*Escape*) und somit wachsen zu können (DUNN et al., 2002). Das Wissen über die konkrete Rolle der MZ im Rahmen dieses komplexen, teils paradoxen Prozesses, währenddessen das Immunsystem sowohl anti- als auch pro-tumorigen agiert, ist bislang unvollständig (SEGURA-VILLALOBOS et al., 2022).

Zur Aufklärung dessen analysierten aktuelle Studien das Transkriptom beider beteiligten Akteure, d.h. tumorassoziierter MZ sowie MZ-assoziiierter Kolonkarzinomzellen. Yu et al. (2019) untersuchten mittels eines Zellkulturmodells die phänotypisch-funktionelle Wirkung von Kolonkarzinomzellen auf MZ. Dabei identifizierten sie in den primären humanen MZ eine Reihe hochregulierter Gene (z.B. *MMP-2*, *VEGF-A*, *PDGFA*), deren Produkte eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen (pro-tumorigen; pro-metastatisch; pro-angiogen; immunsuppressiv). Weiterhin wurde gezeigt, dass der Rezeptor Frizzled 1 (FZD1), ein Rezeptor des Wnt-Signalweges, in kokultivierten MZ hochreguliert war. Die MZ wurden, bereits in der Frühphase der Karzinogenese, durch stimulierende Signale der Krebszellen aktiviert und zur Produktion pro-tumorigener Faktoren angeregt (YU et al., 2018; YU et al., 2019). Auch mittels der Expression von Wnt (als Ligand von FZD1) durch Karzinomzellen (HOLCOMBE et al., 2002) könnte eine Aktivierung des Wnt-Signalweges innerhalb der MZ induziert und somit die Rekrutierung und Reifung von MZ im TMM verstärkt werden (YAMAGUCHI et al., 2016; YU et al., 2019).

In einer früheren Studie zeigten Wang et al. (2016) in MZ-kokultivierten Kolonkarzinomzellen *in vitro* eine verstärkte Expression von *VEGF-A*, *-C* und *TGF- β* sowie eine Aktivierung von MAPK-, Rho-GTPase- und STAT-Signalwegen, welche sich wiederum auf Zelladhäsion, -migration der Karzinomzellen sowie die Tumorangio-genese auswirkt (pro-tumorigen; pro-invasiv; pro-angiogen). Durch gezielte Ausschaltung der MZ mittels eines Fc ϵ -PE40 Toxins, konnte die Karzinogenese *in vitro* und *in vivo* unterbunden werden (WANG et al., 2016).

Eine aktuelle Hypothese besagt, dass tumorassoziierte MZ in der Lage sind von einem anti-inflammatorischen („MC1“) in einen pro-inflammatorischen („MC2“) Polarisierungszustand überzugehen (PRESTA et al., 2019). Welche konkreten Faktoren einen solchen Übergang im Einzelnen auslösen verbleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

Es bleibt festzustellen, dass eine direkte MZ-Tumorzell-Interaktion mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit effektiv besteht, ihre Effekte (pro- vs. anti-tumorigen) jedoch variabel sind.

2 Die intestinale Karzinogenese

2.1 Aufbau der intestinalen Darmwand

Eine schematische Übersicht der intestinalen Schleimhaut und Darmwandschichten bietet Abbildung 3 (SINOWATZ et al., 2012).

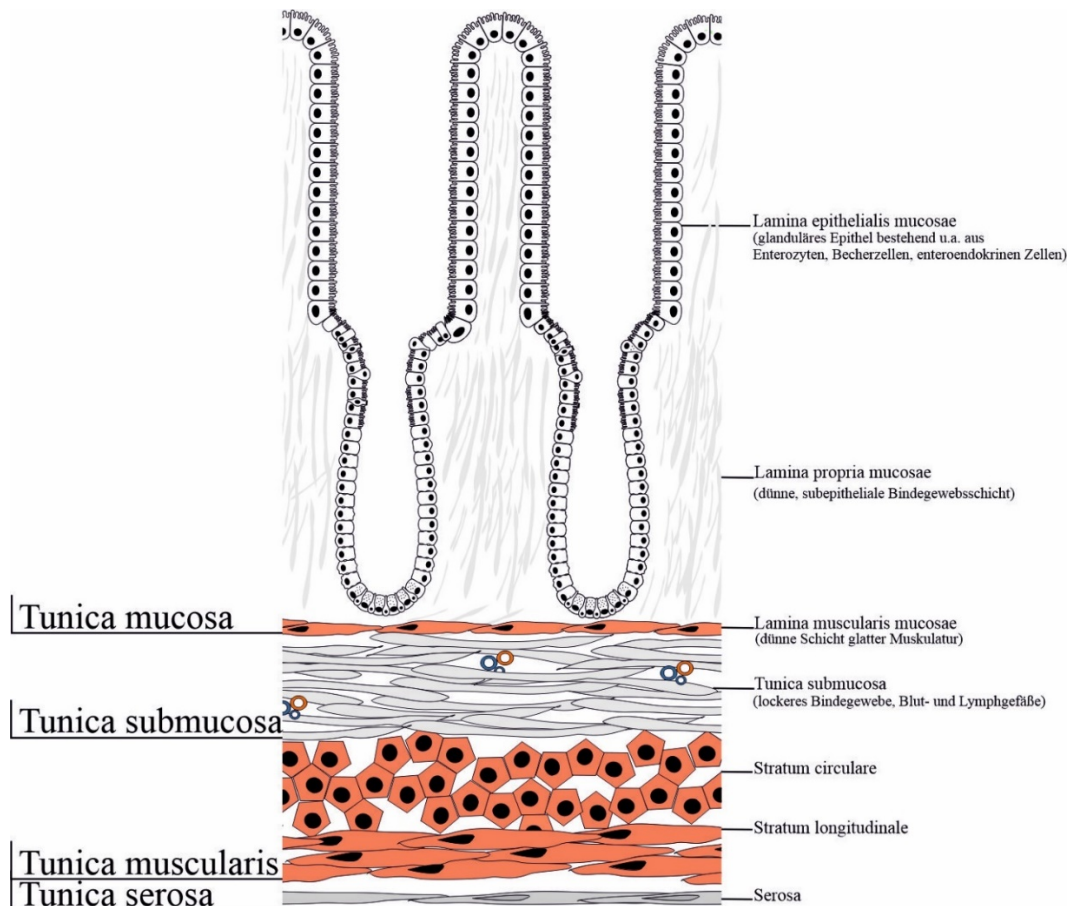


Abbildung 3 | Schematischer Aufbau der intestinalen Darmwand. Schema modifiziert nach Gehart & Clevers (2019), mit freundlicher Genehmigung durch H. Clevers (GEHART & CLEVERS, 2019).

Maligne Karzinome sind durch ungerichtetes, infiltratives Wachstum neoplastischer Zellpopulationen, aus der Lamina epithelialis mucosae durch die Lamina muscularis mucosae hindurch, bis in die Submukosa oder tiefer gelegene intestinale Wandschichten, gekennzeichnet (NOLTE et al., 2016; NAGTEGAAL et al., 2019).

2.2 Intestinale Neoplasien

2.2.1 Adenom-Karzinom-Sequenz

Die Entstehung spontaner Darmneoplasien des Menschen ist durch sukzessive, genetisch heterogene Mutationen verschiedener Tumorsuppressorgene und Onkogene gekennzeichnet. Die sog. Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt die molekulare Entstehung humaner Darmkarzinome aus benignen (prä-malignen) Vorläuferläsionen (VOGELSTEIN et al., 1988) und wurde schon Jahre zuvor von Morson histomorphologisch beschrieben (MORSON, 1962).

Benigne Neoplasien des Drüsenepithels (Adenome) können makroskopisch gestielt, sessil (leicht hervortretend oder flach) oder auch mukosal eingezogen erscheinen. Klassifiziert werden histologisch einerseits, gemäß Wachstumsmorphologie, u.a. tubuläre, villöse bzw. tubulovillöse Adenome, hyperplastische Polypen und traditionelle sessile Adenome sowie sessile serratierte Läsionen. Andererseits, gemäß Differenzierungsgrad, niedrig- bzw. hochgradig dysplastische (low-grade bzw. high-grade) Adenome. Histomorphologisch zeichnen sich diese Vorläuferläsionen durch proliferierende Epithelzellen unterschiedlicher Dysplasiegrade aus und können in einigen Fällen progressiv zu malignen Adenokarzinomen entarten (NAGTEGAAL et al., 2019).

Humane kolorektale Karzinome (KRK) sind maligne Neoplasien des glandulären intestinalen Drüsenepithels, die endo- bzw. exophytisch wachsen, die Lamina muscularis mucosae durchbrechen und in die Submukosa oder tiefer infiltrieren. Die Mehrheit der humanen Kolonkarzinome sind, zumeist nicht weiter spezifizierte, Adenokarzinome (ANOS) (NAGTEGAAL et al., 2019; JESINGHAUS et al., 2021). Des Weiteren wird das humane KRK nach WHO-Klassifikation in verschiedene histopathologische Subtypen eingeteilt (siehe Tabelle A27), und gemäß seines glandulären Dysplasiegrades in „high grade“ und „low grade“ klassifiziert (siehe Tabelle A26) (NAGTEGAAL et al., 2019).

Die Adenom-Karzinom-Sequenz wird auch als „klassischer Pfad“ der Karzinogenese oder, nach den Erstbeschreibern dieses genetischen Modells, als das „Fearon-Vogelstein-Modell“ bezeichnet. Die hierbei wichtigsten genetischen Alterationen lassen sich stark vereinfacht wie folgt zusammenfassen:

- Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (z.B. *APC*, *TP53*)
- Aktivierung von Onkogenen durch die Mutation von Protoonkogenen (z.B. *BRAF*, *KRAS*)

(VOGELSTEIN et al., 1988; FEARON & VOGELSTEIN, 1990).

Zur Modellierung der Adenom-Karzinom-Sequenz werden in der biomedizinischen Forschung zumeist Mausmodelle verwendet, wobei in diesen eine vergleichbare, spontane maligne Adenom-Karzinom-Progression weitaus seltener stattfindet (WARD et al., 2022).

2.2.2 Humane intestinale Neoplasien

Es existieren 2 mögliche genomische Pfade, auf Basis derer sich humane kolorektale Neoplasien durch eine Zunahme genetischer Instabilitäten hauptsächlich entwickeln. Erstens, durch chromosomale Instabilität (CIN) bedingt durch eine Akkumulation somatischer Mutationen (v.a. *APC*, *TP53*, *KRAS*). Zweitens, durch Mikrosatelliteninstabilität (MSI), aufgrund von defekten DNA-Mismatch-Reparaturproteinen (MMR) und infolgedessen auftretenden Fehlern während der DNA-Replikation (NETWORK, 2012; NAGTEGAAL et al., 2019).

Am häufigsten entsteht das sporadische humane KKR über den erstgenannten Weg, den sog. „klassischen Pfad“ der Adenom-Karzinom-Sequenz, wobei akkumulierende Mutationen an einen bestimmten (prä-)neoplastischen Phänotyp gekoppelt sind. Im Rahmen der Tumorentstehung kommt es zu Alterationen in meist 4 bis 6 Genen, die in einer präferenziellen Sequenz auftreten, wobei die Akkumulation der Mutationen bedeutender ist als deren Reihenfolge. Die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt zur progredienten Entwicklung von Adenomen zu Karzinomen. Die Anzahl an Mutationen und die CIN nimmt vom Adenom zum Karzinom hin zu (FEARON & VOGELSTEIN, 1990).

Die initiale und häufigste somatische Mutation betrifft zumeist das *APC*-Gen, das beim Menschen auf dem Chromosom 5q liegt und als Tumorsuppressorgen im Rahmen des Wnt-Signalweges einen signifikanten Einfluss auf die Karzinogenese hat (FEARON & VOGELSTEIN, 1990; SENDA et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2017). Durch Mutationen dieses Gens und der folgenden strukturellen Alteration und Inaktivierung des APC-Proteinkomplexes, kann der Transkriptionsfaktor β -

Catenin im Rahmen eines Abbaukomplexes, bestehend aus Axin, Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) und APC, nicht mehr phosphoryliert, ubiquitiniert und proteasomal degradiert werden. β -Catenin wird stabilisiert, akkumuliert zunächst zytoplasmatisch und darauffolgend auch intranukleär. Im Nukleus wirkt β -Catenin als transkriptioneller Aktivator oder Repressor zellzyklusregulierender Gene (GORDON & NUSSE, 2006; HERBST et al., 2014). Bei der Familiären Adenomatösen Polyposis coli (FAP) führt eine vererbte Dysfunktion des *APC*-Gens zur Entwicklung zahlreicher kolorektaler Adenome bzw. Karzinome (RUSTGI, 2007). Auch direkt *CTNNB1*-aktivierende Mutationen sind an der humanen kolorektalen Karzinogenese, meist in Zusammenhang mit dem hereditären nichtpolypösen KRK (Lynch-Syndrom), beteiligt (ARNOLD et al., 2020). Metastatische KRK des Menschen weisen mehrheitlich Mutationen im *APC* oder *CTNNB1*-Gen auf (YAEGGER et al., 2018).

Eine weitere häufige, früh auftretende Genmutation betrifft das *KRAS*, ein Protoonkogen (FEARON & VOGELSTEIN, 1990). *KRAS* ist zusammen mit *BRAF* an MAPK-Signalkaskaden beteiligt. *KRAS* wird durch Mutationen im *KRAS*-Gen in seiner aktiven GTP-gebundenen Form stabilisiert und aktiviert die MAPK-Kaskade somit konstitutiv und unkontrolliert. Die MAPK-Kaskade ist an transmembranöse Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. EGFR) gekoppelt (KOVEITYPOUR et al., 2019). Diese bilden den Beginn des MAPK-Signalweges und werden heute als therapeutische Ziele genutzt, wobei nur Patienten ohne aktivierende *KRAS*-Mutation von einer anti-EGFR-Therapie profitieren (JIANG et al., 2009). Denselben, MAPK-aktivierenden Effekt haben *BRAF*-Mutationen (KOVEITYPOUR et al., 2019). *BRAF*^{V600E} und *KRAS* sind besonders häufig im Kontext des sog. „serratierten“ Karzinogenesepfades mutiert (CHAN et al., 2003; STEFANIUS et al., 2011). Histomorphologisch zeichnen sich die Vorläuferläsionen des *BRAF* bzw. *KRAS*-initiierten, serratierten Karzinogenesepfades durch ihre serratierte (sägezahnartige) Epithelarchitektur aus (NAGTEGAAL et al., 2019). Bei sessilen serratierten Läsionen ist die epigenetische Instabilität bzw. der CpG-Island-Methylator Phänotyp (CIMP) durch vermehrte DNA-Methylierung von Cytosin in CpG-Inseln besonders hoch (CIMP-H). Die so entstehende Promotorhypermethylierung führt zu einer Abschaltung der Transkription der entsprechenden Genbereiche (z.B. von DNA-MMR-Genen wie *MLH1*) (YAMANE et al., 2014; NAGTEGAAL et al., 2019). Eine späte Mutation (in Karzinomen) betrifft *TP53* auf dem Chromosom 17p

(FEARON & VOGELSTEIN, 1990), das als Tumorsuppressorgen multiple Funktionen im Zellzyklus erfüllt (G1-S *Checkpoint*; DNA-Reparatur; Apoptose) (LANE, 1992).

Die MSI, als Ausdruck einer MMR-Defizienz (d.h. defekter MMR-Gene *MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*), wird in humanen KRK molekular, mittels PCR und Fragmentlängenanalyse, oder immunhistochemisch, mittels eines AK-Panels aus *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* und *MSH6*, bestimmt (BOLAND et al., 1998; JESINGHAUS et al., 2021). Die Eigenschaft der (hochfrequenten) MSI (*MSI-high*) (negatives, immunhistochemisches Signal für *MLH1/PMS2*; oder *MSH2/MSH6*; oder isoliertes, negatives Signal für *PMS2* oder *MSH6*) ist ein Charakteristikum des Lynch-Syndrom-assoziierten, hereditären KRK, kann aber auch isoliert vorkommen. Sie hat, nicht zuletzt in Zusammenhang mit dem *BRAF*-Mutationsstatus sowie im Rahmen einer Immuncheckpointtherapie, therapeutische bzw. prädiktive Relevanz (HALL et al., 2010; NAGTEGAAL et al., 2019; JESINGHAUS et al., 2021). Bereits anhand (histo-)morphologischer Kriterien (z.B. Nekrose, tumorinfiltrierende Lymphozyten, Tumorlokalisierung) kann die Wahrscheinlichkeit einer MSI am HE-Schnitt abgeschätzt werden (GREENSON et al., 2009).

Generell lässt sich festhalten, dass die genetische Heterogenität humaner KRK weitaus größer ist als es das stark simplifizierte Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz suggeriert. Wood et al. (2007) beschreiben die genetischen Eigenschaften von Kolonkarzinomen als *“a handful of commonly mutated gene „mountains“ and a much larger number of gene „hills“ that are mutated at a low frequency”* (WOOD et al., 2007).

2.2.3 Ausgewählte Mausmodelle der intestinalen Karzinogenese

Mausmodelle sollen die „klassische“ oder „serratierte“ humane kolorektale Tumorgenese (NAGTEGAAL et al., 2019) möglichst getreu nachbilden. Durch Fokussierung auf die Veränderung der Aktivität meist einzelner Gene stellen sie ein vereinfachtes, genetisch reines Modell zur Untersuchung von KRK dar und sollen helfen, Schritt für Schritt die der spontanen Karzinogenese zugrundeliegenden, hochkonservierten, molekularen Signalprozesse aufzuklären. Es bleibt zu bedenken, dass dies eine unnatürliche Vereinfachung der molekulargenetisch hoch komplexen Vorgänge in humanen KRK ist, und dass die im Mausmodell erlangten Erkenntnisse stets kritisch reflektiert werden müssen und nur bedingt direkt auf die weitaus

komplexere humane Situation translatiert werden können (CHEON & ORSULIC, 2011; WASHINGTON et al., 2013).

Generell lassen sich die folgenden Mausmodellssysteme unterscheiden, in denen durch klar definierte genetische Alterationen, meist einzelner Tumorsuppressorgene und/oder Onkogene, das Auftreten und die Progression von Neoplasien induziert werden kann (siehe Tabelle 3) (STEIGER, 2020).

Im Folgenden sollen ausgewählte genetisch modifizierte Mausmodelle (GEMM), welche in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch untersucht wurden (siehe Kapitel XIII.2.2), bzw. die den Modellen zugrundeliegenden, molekularen Mechanismen der intestinalen Karzinogenese, kurz ausgeführt werden.

Tabelle 3 | Übersicht verschiedener häufig angewandter Mausmodellssysteme in der pathoökologischen Forschung. Modifiziert nach Steiger (2020) (STEIGER, 2020).

Art des Modells	Name des Modells	Beschreibung
Komplexe, biologisch/genetisch modifizierte/erzeugte Mausmodelle	Chemisch-toxisch/Karzinogen/metabolisch induziert	Systemisch, meist auf Basis genetischer Alterationen, evtl. organspezifisch
	Mutagenese Screen	Chemische oder Transposon-Mutagenese
	Komplexe, gezielt genetisch keimbahnmodifizierte Mausmodelle (GEMM)	Konstitutiv aktive Mutation, systemisch (Ganzkörper <i>Knock-in/Knock-out</i>)
	Konditionale/induzierbare organspezifische GEMM	Transgene Tiere mit organ- bzw. zelltypspezifischem Promotor, örtlich begrenzter genetischer Veränderung
	Konditionale/induzierbare GEMM	Transgene Tiere mit örtlich und zeitlich begrenzter genetischer Veränderung
	GEMM: Genetisch Modifizierte Mausmodelle	

2.2.3.1 Chemisch-toxisch induzierte Mausmodelle

Mittels Azoxymethan (AOM)/Dextran Natriumsulfat (DSS)-Gabe lässt sich im Mausmodell auf chemisch-toxische Weise die intestinale Tumorgenese induzieren und somit das kolitisassoziierte, humane KRC modellieren. AOM ist ein Prokarzinogen, welches zunächst (v.a. im Kolon) DNA-schädigend wirkt. Durch nachfolgende zyklische, orale Gabe von DSS kommt es zum Auftreten einer hochgradigen Kolitis und in Folge dessen zur Entwicklung intestinaler Tumore (PARANG et al., 2016). Dennoch spielt, neben der inflammatorischen Komponente, der genetische

Hintergrund bzw. Mausstamm beim AOM/DSS-Protokoll eine wichtige Rolle für den Ablauf der inflammationsassoziierten Karzinogenese. So beeinflusst bspw. die verschiedenartige Immunzellaktivität unterschiedlicher Mausstämme das Tumorgeschehen kritisch. Wie von Leo et al. (2015) durch die Untersuchung von *Apc^{Min/+};Card9^{+/+}* bzw. *Apc^{Min/+};Card9^{-/-}* Mäusen gezeigt wurde, fördert CARD9, eine zentrale Komponente des CBM (CARD/BCL10/MALT1)-Signalkomplexes in Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, in männlichen Mäusen die Entstehung kolorektaler Tumore (LEO et al., 2015). Eine weitere Studie im kolitisassoziierten, AOM/DSS-induzierten *Card9^{-/-}* Mausmodell der intestinalen Karzinogenese legt dar, dass CARD9 die intestinale epitheliale Proliferation und Regeneration reguliert. Durch die funktionelle Beeinträchtigung von CARD9 lässt sich das inflammationsbedingte Tumorwachstum beeinflussen (BERGMANN et al., 2017). Mittels gezielter CBM-Manipulation in bestimmten Immunzellpopulationen sowie in intestinalen Epithelzellen soll die Progression intestinaler Tumore hinsichtlich der Rolle weiterer am CBM-Signalkomplex beteiligter Faktoren untersucht werden (J. RULAND, persönliche Kommunikation, 2020), wobei der Fokus im Rahmen dieser Arbeit, neben einer detaillierten histomorphologischen Charakterisierung der Neoplasien, insbesondere auf die Rolle der MMZ gelegt wurde. Chemisch-toxisch induzierte, murine Kolontumore ähneln in ihren genetischen Eigenschaften dem humanen KRK (z.B. Dysregulationen im Wnt-Signalweg, *KRAS*-Aktivierung) (DE ROBERTIS et al., 2011; KARIM & HUSO, 2013).

2.2.3.2 Mausmodelle mit Manipulation des Wnt-Signalweges

Beim *Apc^{Min/+}* Mausmodell handelt es sich um ein Modell zur Erforschung früher Darmkrebsstadien der humanen FAP, welches mittels des Mutagens Ethylnitrososulfon generiert wurde (MOSER et al., 1990). *Apc^{Min/+}* Mäuse entwickeln multiple intestinale Neoplasien (MIN). Ein gewichtiger Nachteil ist, dass, im Gegensatz zur humanen Erkrankung, maligne Tumorprogression und Metastasen selten auftreten und die murinen Tumore nicht kolorektal, sondern v.a. dünn darmseitig lokalisiert sind (KARIM & HUSO, 2013; JACKSTADT & SANSOM, 2016). Aufgrund der Häufigkeit somatischer *APC*-Mutationen in humanen KRK (48 %) (SCHNEIDER et al., 2017) sind bis dato zahlreiche, weitere *Apc*-Mausmodelle entwickelt worden (JACKSTADT & SANSOM, 2016). Cheung et al. (2010) zeigten, dass sich durch eine totale Deletion des *Apc*-Gens im Mausmodell (*Apc^{+/fleo1-15}*) die

Bildung multipler Adenome in Dünndarm und Colon beschleunigt (CHEUNG et al., 2010).

β -Catenin ist, wie bereits unter Kapitel II.2.2.2 beschrieben, ebenso wie APC Teil des Wnt-Signalweges. Liegt β -Catenin konstant aktiviert vor, führt dies zu seiner Translokation vom Zytoplasma in den Nukleus, einer Dysregulation bestimmter, TCF/LEF-abhängiger Zielgene und final zur Beeinflussung von u.a. Zellmigration und -proliferation (HERBST et al., 2014). Harada et al. (1999) zeigten, dass GEMM mit dominanter aktivierender Mutation des β -Catenin-codierenden Gens (*Catnb*^{*Δex3*}) intestinale Adenome in Dünndarm und Colon entwickelten. Im *Catnb*^{*Δex3*} Modell wird β -Catenin durch den Verlust seiner Phosphorylierungsstelle nicht mehr durch die GSK-3 β phosphoryliert und in Folge degradiert, sondern konstant in aktiver Form stabilisiert (HARADA et al., 1999).

2.2.3.3 Mausmodelle mit Manipulation des MAPK-Signalweges

Braf^{*V637E*} ist das murine Ortholog der humanen *BRAF*^{*V600E*}-Mutation. Im *Villin*^{*Cre*};*Braf*^{*V637E/+*} Mausmodell (Cre-induzierbares *Knock-in*) führt die Expression des mutierten, aktivierten Gens *Braf*^{*V637E*} in intestinalen Epithelzellen zur Daueraktivierung des MAPK-Signalweges, vermehrter intestinaler Proliferation und final zur Ausbildung serratierter Läsionen, ähnlich traditioneller serratierter Adenome bzw. serratierter Adenokarzinome des Menschen. Diese Läsionen entwickelten sich vorwiegend im murinen Dünndarm, wohingegen sie im Menschen typischerweise im Dickdarm auftreten (RAD et al., 2013).

Eine weitere Möglichkeit zur Modellierung und Untersuchung des serratierten Karzinogenesepfades mittels Alterationen des MAPK-Signalweges bieten Mausmodelle mit mutiertem *Kras*-Gen (*Villin*^{*Cre*};*Kras*^{*G12D/+*}). Diese Mäuse entwickelten intestinale Hyperplasien, welche sich nach einer relativ langen Latenzzeit von 1 Jahr lediglich im Dünndarm progredient (Adenom) zeigten. Erst die zusätzliche Deletion von *Ink4a/Arf* (*Villin*^{*Cre*};*Kras*^{*G12D/+*};*Ink4a/Arf*^{*Δ/Δ*}) führte teils zum Auftreten invasiver Karzinome im murinen Colon (BENNECKE et al., 2010).

2.2.4 Feline intestinale Neoplasien

Adenokarzinome sind neben Lymphomen die zweithäufigste intestinale Neoplasie der Katze (RISSETTO et al., 2011; SCHWITTLICK et al., 2020). Ältere Tiere (ab einem Alter von ca. 7 Jahren) erkranken häufiger an intestinalen Neoplasien und eine Rasseprädisposition für Siamkatzen ist bekannt (PATNAIK et al., 1976; TURK et al., 1981; RISSETTO et al., 2011). Im Gegensatz zur induzierten Modellierung humaner Tumore im Mausmodell, zeichnen sich Neoplasien der Katze durch ihr spontanes Auftreten aus. Spontane intestinale Adenokarzinome der Katze treten sowohl in Dünndarm- als auch Dickdarm auf, wobei einige Autoren den Dünndarm (PATNAIK et al., 1976; TURK et al., 1981), andere wiederum den Dickdarm (RISSETTO et al., 2011; SCHWITTLICK et al., 2020; UNEYAMA et al., 2021b) als am häufigsten betroffen nennen. Es existieren nur vereinzelt Studien zu feline intestinalen Neoplasien, benigne intestinale Adenome im Sinne präneoplastischer Vorläuferläsionen treten auch bei der Katze auf, werden in der Literatur jedoch kaum erwähnt (OLIN et al., 1968; UNEYAMA et al., 2021a) bzw. selten diagnostiziert (MUNDAY, 2017). Intestinale Adenokarzinome der Katze sind biologisch aggressiv, metastasieren schnell und meist in das Peritoneum oder lokale Lymphknoten (MUNDAY, 2017). Ebenso sind Fernmetastasen (in Leber, Lunge, Milz, Niere) beschrieben (PATNAIK et al., 1976). Slawienski et al. (1997) empfehlen therapeutisch eine subtotale Kolektomie mit adjuvanter Doxorubicin-Chemotherapie (SLAWIENSKI et al., 1997). Veterinär-onkologische Standardwerke konstatieren jedoch, dass eine adjuvante Chemotherapie keinen therapeutischen Benefit hat (HAMMER & KESSLER, 2005; WILLARD, 2010). Die offizielle veterinärmedizinische Richtlinie zur histomorphologischen Klassifizierung feline intestinaler Neoplasien ist, wie auch in der Humanmedizin, die *World Health Organization* (WHO)-Klassifikation der Tumore des Verdauungstraktes der Haustiere (HEAD et al., 2003). Da diese Klassifikation jedoch knapp 20 Jahre alt ist, ist aktuell eine Überarbeitung nach aktuellem Forschungsstand sowie eine Standardisierung der Befundung und Klassifizierung von Tumorerkrankungen bei Haustieren vonnöten (MEUTEN et al., 2021). Eine mögliche Lösung bietet die Orientierung an der humanen WHO-Klassifikation der Tumore des Kolons und Rektums (siehe Tabellen A26 und A27).

3 Wissenschaftliche Fragestellungen

Wie in der Literaturübersicht dargestellt wurde, ist das murine Modell gut geeignet für die spezifische und grundlegende Untersuchung einzelner, immunologisch-molekularer Zusammenhänge, bildet jedoch die Komplexität heterogener intestinaler, invasiver Neoplasien, wie sie sich bei Mensch und Katze spontan entwickeln, nicht ausreichend ab. Hieraus ergibt sich die erste Fragestellung:

- Bilden spontane intestinale Neoplasien der Katze das humane kolorektale Karzinom auf morphologischer und molekularer Ebene ab?

Diese Thematik wurde mittels einer morphologisch-deskriptiv vergleichenden Untersuchung, begleitet von molekularen Analysen, bearbeitet.

Die zweite Fragestellung betrifft die speziesübergreifende Charakterisierung einiger Eigenschaften intestinaler, intratumoraler MZ. Die wesentlichen offenen, wissenschaftlichen Fragen sind hier:

- Existieren ieMMZ bzw. Zellen mit vergleichbarer Enzymausstattung auch in anderen Spezies als der Maus?
- Wie verhält sich die Anzahl an tumorinfiltrierenden ieMMZ im Verlauf der Tumorprogression (Adenom-Karzinom-Sequenz)?
- Katalysieren ieMMZ Entstehung, Wachstum und Entwicklung intestinaler Neoplasien?
- Sind durch die vergleichende Untersuchung intratumoraler MMZ-Subpopulationen spezies- bzw. mausmodellspezifische Rückschlüsse hinsichtlich ihrer Rolle im Kontext der intestinalen Karzinogenese möglich?

Diese Fragen wurden mittels immunhistochemischen Untersuchungen sowie semi-quantitativer Evaluation histologischer Schnittpräparate intestinaler (Prä-)Neoplasien von Maus, Mensch und Katze bearbeitet.

Die hier vorgelegte Arbeit soll durch Beleuchtung dieser Fragen einen Beitrag zur immunonkologischen Erforschung und immunologischen Charakterisierung von Darmkrebs leisten und somit möglicherweise zu einer Verbesserung therapeutischer Optionen in Human- und Veterinärmedizin beitragen.

III PUBLIKATIONEN

1 Publikation I

Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas

Tanja Groll^{1,2,3}, Franziska Schopf^{1,2}, Daniela Denk^{1,2,3}, Carolin Mogler^{1,2}, Ulrike Schwittlick⁴, Heike Aupperle-Lellbach⁴, Sabrina Rim Jahan Sarker^{1,2}, Nicole Pfarr¹, Wilko Weichert¹, Kaspar Matiasek³, Moritz Jesinghaus^{1,5}, Katja Steiger^{1,2,*}

¹ Institute of Pathology, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

² Comparative Experimental Pathology, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

³ Institute of Veterinary Pathology, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

⁴ LABOKLIN GmbH & Co.KG, Bad Kissingen, Germany

⁵ Department of Pathology, University Hospital Marburg, Marburg, Germany

Cancers (Basel), veröffentlicht.

Cancers (Basel). 2021;13(23):5941. Published 2021 Nov 25.

<https://doi.org/10.3390/cancers13235941>

*Tanja Groll presented preliminary parts of this study at the **ESTP/ESVP/ECV Cutting Edge Pathology Congress 2021**.*



Article

Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas

Tanja Groll ^{1,2,3} , Franziska Schopf ^{1,2}, Daniela Denk ^{1,2,3}, Carolin Mogler ^{1,2} , Ulrike Schwittlick ⁴, Heike Aupperle-Lellbach ⁴, Sabrina Rim Jahan Sarker ^{1,2}, Nicole Pfarr ¹ , Wilko Weichert ¹, Kaspar Matiassek ³, Moritz Jesinghaus ^{1,5} and Katja Steiger ^{1,2,*}

¹ Institute of Pathology, School of Medicine, Technical University of Munich (TUM), 81675 Munich, Germany; tanja.groll@tum.de (T.G.); f.schopf@campus.lmu.de (F.S.); daniela.denk@patho.vetmed.uni-muenchen.de (D.D.); carolin.mogler@tum.de (C.M.); sabrina.sarker@tum.de (S.R.J.S.); nicole.pfarr@tum.de (N.P.); wilko.weichert@tum.de (W.W.); moritz.jesinghaus@uni-marburg.de (M.J.)

² Comparative Experimental Pathology, School of Medicine, Technical University of Munich (TUM), 81675 Munich, Germany

³ Institute of Veterinary Pathology, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet (LMU), 80539 Munich, Germany; kaspar.matiassek@neuropathologie.de
⁴ LABOKLIN GmbH & Co. KG, 97688 Bad Kissingen, Germany; schwittlick@laboklin.com (U.S.); aupperle@laboklin.com (H.A.-L.)

⁵ Department of Pathology, University Hospital Marburg, 35043 Marburg, Germany

* Correspondence: katja.steiger@tum.de; Tel.: +49-89-4140-6075; Fax: +49-89-4140-4865



Citation: Groll, T.; Schopf, F.; Denk, D.; Mogler, C.; Schwittlick, U.; Aupperle-Lellbach, H.; Sarker, S.R.J.; Pfarr, N.; Weichert, W.; Matiassek, K.; et al. Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas. *Cancers* **2021**, *13*, 5941. <https://doi.org/10.3390/cancers13235941>

Academic Editor: Heike Allgayer

Received: 8 November 2021

Accepted: 22 November 2021

Published: 25 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer deaths in humans (2020) but modeling late-stage human CRC, including high tumor budding and metastatic activity, experimentally in mouse models is a major challenge. In the present study, histopathological, immunohistochemical and molecular features of spontaneous intestinal carcinomas in cats were evaluated with a special focus on their potential applicability as a valuable model for human CRC. Feline intestinal tumors display aggressive growth patterns and adequately model invasive late-stage human CRC. They exhibit the same histological subtypes and display strikingly high tumor budding activity, both of which are highly significant prognostic factors in human CRC. Moreover, human and feline colorectal tumors harbor the same mutations of the *CTNNB1* gene, encoding β -catenin. Our data indicate that feline intestinal carcinomas constitute a valuable and promising *in vivo* model for human CRC. Further comparative oncological research, and especially investigation of the molecular landscape of feline intestinal neoplasms, is imperative.

Abstract: Limited availability of *in vivo* experimental models for invasive colorectal cancer (CRC) including metastasis and high tumor budding activity is a major problem in colorectal cancer research. In order to compare feline and human intestinal carcinomas, tumors of 49 cats were histologically subtyped, graded and further characterized according to the human WHO classification. Subsequently, feline tumors were compared to a cohort of 1004 human CRC cases. Feline intestinal tumors closely resembled the human phenotype on a histomorphological level. In both species, adenocarcinoma not otherwise specified (ANOS) was the most common WHO subtype. In cats, the second most common subtype of the colon (36.4%), serrated adenocarcinoma (SAC), was overrepresented compared to human CRC (8.7%). Mucinous adenocarcinoma (MAC) was the second most common subtype of the small intestine (12.5%). Intriguingly, feline carcinomas, particularly small intestinal, were generally of high tumor budding (Bd) status (Bd3), which is designated an independent prognostic key factor in human CRC. We also investigated the relevance of feline *CTNNB1* exon 2 alterations by Sanger sequencing. In four cases of feline colonic malignancies (3 ANOS, 1 SAC), somatic missense mutations of feline *CTNNB1* (p.D32G, p.D32N, p.G34R, and p.S37F) were detected, indicating that mutational alterations of the WNT/ β -catenin signaling pathway potentially play an essential role in feline intestinal tumorigenesis comparable to humans and dogs. These results indicate that spontaneous intestinal tumors of cats constitute a useful but so far underutilized model for human CRC. Our

study provides a solid foundation for advanced comparative oncology studies and emphasizes the need for further (molecular) characterization of feline intestinal carcinomas.

Keywords: spontaneous feline intestinal tumors; comparative oncology; colorectal cancer; tumor budding; *CTNNB1*

1. Introduction

Worldwide, colon cancer is the third most common cancer type in humans, with an estimated 1.9 million new cases in 2020 and it is the second leading cause of cancer deaths [1]. To date, the most frequently used animal models in colon cancer research are mice with experimentally induced intestinal cancer; however, modeling late stages of human CRC is a major challenge as several mouse models tend to develop a high tumor burden, but no metastasis, leading to preliminary death. Invasively growing, metastasizing tumors of the large intestine, comparable with late-stage human CRC, are difficult to model in clean-housed experimental animal models, particularly genetically engineered mouse models (GEMM) [2–5]. Similarly, other animal models, e.g., rats or pigs, lack the ability to model metastasis and invasive carcinoma [3]. Moreover, the genotype of human tumors appears to be more heterogeneous than the one of experimentally induced murine tumors [6]. Spontaneously arising intestinal tumors of companion animals (pets) thus are of special interest for comparative research, especially since companion animals share their living environment with humans [7].

At present, there are only few studies of feline intestinal cancer, its biological behavior, clinical, histopathological, and molecular features. In cats, lymphoma is the most common intestinal neoplasm followed by intestinal carcinoma with a study-dependent incidence varying from 17 to 31.5% among gastrointestinal neoplasias [8–10]. Feline intestinal carcinomas are more prevalent than canine ones [11] and occur in both the large and small intestine. The available literature provides contradictory statements regarding the most commonly affected site in cats [8,9,11–14]. Feline intestinal carcinomas are more frequent in older animals with increasing risk starting from the age of seven [8,9] and either a breed predisposition of Siamese cats [9,11,13] or no breed predisposition [8,12] has been reported. Tumors metastasize frequently, rapidly, and most often within the peritoneum or to local lymph nodes, but also to distant sites (lung, liver, spleen) [8,11,13,15]. Subtotal colectomy via laparotomy is the current standard treatment but mean overall survival time of cat patients is generally low (68 to 274 days), as recurrence and metastases are common [11,15,16].

The aim of the present study was to characterize sporadic primary feline intestinal carcinomas histologically and molecularly in order to further compare them to human CRC. WHO subtype, tumor grading and tumor budding status are valuable prognostic tools in human CRC [17,18] and feline tumors were characterized according to the current human WHO classification [19].

Mutations, which stabilize the *CTNNB1* gene encoding for β -catenin and thus activate the canonical WNT/ β -catenin signaling pathway, play a pivotal role in the pathogenesis of human [20,21] and canine [22] intestinal cancer. Based on previous immunohistochemical findings of other authors, showing that dysregulated and nuclear translocated β -catenin was present in spontaneous feline intestinal carcinomas [12], we shed light on the mutational status of feline *CTNNB1* by performing Sanger sequencing of feline *CTNNB1* exon 2 for the first time.

2. Materials and Methods

2.1. Feline Study Cohort

Thirty-three cases of spontaneous feline colorectal and sixteen cases of feline small intestinal carcinoma were collected from the tissue archive of LABOKLIN GmbH & Co. KG

(Bad Kissingen, Germany) between the years 2013 and 2020. All samples (7 full-thickness biopsies and 42 surgical specimens) were obtained during laparotomy, submitted for pathological routine diagnostics, and reviewed retrospectively. In 20/49 cases, additional lymph node samples were available.

Intestinal tumor samples originated from cats of different breeds including 31 European Shorthair (ESH) cats (63.3%), 4 British Shorthair cats (8.2%), 3 Persian cats (6.1%), 2 Chartreux cats (4.1%), 2 Maine Coon cats (4.1%), 1 Exotic Shorthair cat (2%), 1 Norwegian Forest cat (2%), 1 Oriental Shorthair cat (2%), 1 Siamese cat (2%) and 3 mixed cat breeds (6.2%). The study set included 26 males (53.1%; 20/26 castrated) and 23 females (46.9%; 15/23 spayed), and the age at the time of diagnosis ranged from 4 to 17 years. Mean age (\pm SD) was 11.51 years (\pm 3.31 years). Detailed information on the feline cohort is provided in Tables S1 and S2.

2.1.1. Tissue Processing

Tissue samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin and routinely processed for histology. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was carried out following standard protocols. A Periodic Acid Schiff (PAS) reaction was performed on six selected cases in order to visualize intracytoplasmic mucin for validating the diagnosis of signet-ring cell carcinoma (SRCC). All slides were scanned in 40 \times magnification using a high-throughput slide scanner (Aperio AT2, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). The histological classification of tumors was based on H&E and PAS-stained slides and carried out by a trainee veterinary pathologist (T.G.) under the supervision of experienced board-certified human (M.J., C.M.) and veterinary pathologists (D.D., K.S.). Immunohistochemistry (IHC) for β -catenin, Ki-67, Pan-cytokeratin and CD31 was performed. Detailed information on the IHC protocols and primary antibodies is provided in Table S3. Representative images were taken using Aperio ImageScope \times 64 (v.12.4.0.7018, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

2.1.2. Histomorphological Characterization

For comparative reasons, the histological subtype classification of feline tumors was performed based on the current human WHO classification guidelines [19]. The following human WHO subtypes were identifiable amongst the feline intestinal carcinomas: adenocarcinoma not otherwise specified (ANOS), serrated adenocarcinoma (SAC), mucinous adenocarcinoma (MAC), micropapillary adenocarcinoma (MPC), and signet-ring cell carcinoma (SRCC). ANOS is considered a malignant epithelial neoplasia displaying glandular differentiation. SAC is characterized by glandular serration and consists of tumor cells with a low nucleus-to-cytoplasm ratio, which may be mixed with mucinous areas. MAC is defined by significant pools of extracellular mucin that contain tumor cells and form >50% of the tumor. MPC consists of \geq 5% of small tumor cell clusters surrounded by stromal spaces, morphologically mimicking lymphatic or vascular channels, and therefore displays typical retraction artefacts [23]. SRCC consists of signet-ring cells forming >50% of the tumor, and containing prominent intracytoplasmic mucin, characteristically impressing and partially displacing the nucleus to the periphery. Carcinomas of all types with <50% areas containing mucin are designated as having a mucinous component [19].

The International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) of 2016 achieved standardized classification for tumor budding in human colon cancer, establishing a clearly delineated tumor budding scoring scheme. Tumor buds were defined as individual or clusters of up to four cancer cells detached from the main tumor mass and counted in one hotspot area (0.785 mm²) at the invasive front on an H&E slide (20 \times). Clinically relevant cut-off values were defined in a 3-tier system as low (0–4 buds), intermediate (5–9 buds) and high (\geq 10 buds), and termed Bd1, Bd2, and Bd3, respectively [18] (Figure S1). Tumor budding assessment was carried out for feline tumors in the same manner (Figure 1).

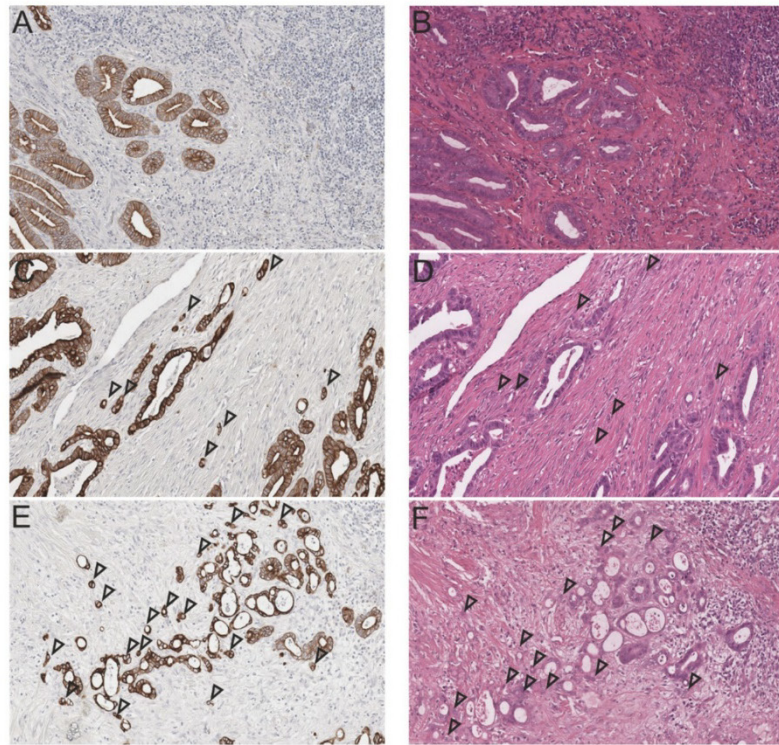


Figure 1. Tumor budding (TB) in the invasive front of feline intestinal carcinomas according to the 3-tier-system for budding assessment of human CRC (left: Pan-cytokeratin, right: H&E, consecutive sections, 20×). Tumor buds are indicated by arrow heads; (A) Low TB activity (Bd1, Pan-cytokeratin); (B) Low TB activity (Bd1, H&E); (C) Moderate TB activity (Bd2, Pan-cytokeratin); (D) Moderate TB activity (Bd2, H&E); (E) High TB activity (Bd3, Pan-cytokeratin); and (F) High TB activity (Bd3, H&E). For corresponding human H&E sections see Figure S1.

Adapted from the human WHO classification of 2019, a 2-tiered grading of feline intestinal tumor was based on the differentiation degree of cellular gland formations in the least differentiated tumor area. In consequence, the neoplasms were categorized as either “low-grade” ($\geq 50\%$ gland formation; well to moderately differentiated) or “high-grade” ($< 50\%$ gland formation; poorly differentiated) [19].

All neoplasms were scored for 10 additional histological parameters including vascular and lymphatic invasion, perineural growth, invasion depth, lymph node metastasis, inflammatory cell infiltration, scirrhous reaction, presence of osseous metaplasia, a mucinous component and mucosal ulceration. Vascular (extra- and intra-mural) and lymphatic invasion as well as perineural growth were assessed as either absent (0) or present (1). Invasion depth was scored as infiltrating the lamina muscularis propria (1), the tunica muscularis (2), or the serosa or greater omentum (3). A cumulative score of invasiveness, including vascular (1), lymphatic (1), perineural (1), and serosal (1) infiltration was calculated (max. score of 4). Regional lymph nodes were available for histological evaluation of metastasis in 20/49 cases. Cellular immune response was measured semi-quantitatively by scoring the inflammatory infiltrate in the tumorous area as either absent (0), mild (1; mucosal), moderate (2; mucosal, submucosal and partly involving the tunica muscularis), or severe

(3; involving all intestinal layers). A scirrhous reaction, mucinous component, osseous metaplasia, and mucosal ulceration were determined as either absent (0) or present (1).

Mitotic count (MC) was assessed digitally in an area equaling 10 high-power fields (hpf; 40 \times) on a standard monitor using Aperio ImageScope X64 (Leica Biosystems). Assuming 2.37 mm² was agreed to be the standard field area of 10 hpf and 0.0954 mm² was the area of one hpf in the aforementioned setting, 25 40 \times image fields were counted to equal the standard hpf area. The MC was performed randomly within the most densely cellular areas of the neoplasm and cell poor areas were excluded [24]. The total number of mitoses/10 hpf (2.37 mm²) were scored as follows: 0–9 mitoses (1); 10–19 mitoses (2); and \geq 20 mitoses (3).

2.1.3. Semiquantitative Evaluation and Computer-Assisted Image Analysis

Beta-catenin immunoreactivity, in terms of a nuclear translocation of β -catenin, was scored semiquantitatively: 0 (negative; <5% positive cells); 1 (5–25% positive cells); 2 (26–50% positive cells); and 3 (>50% positive cells) (modified score from Uneyama et al.) [12] (Figure 2).

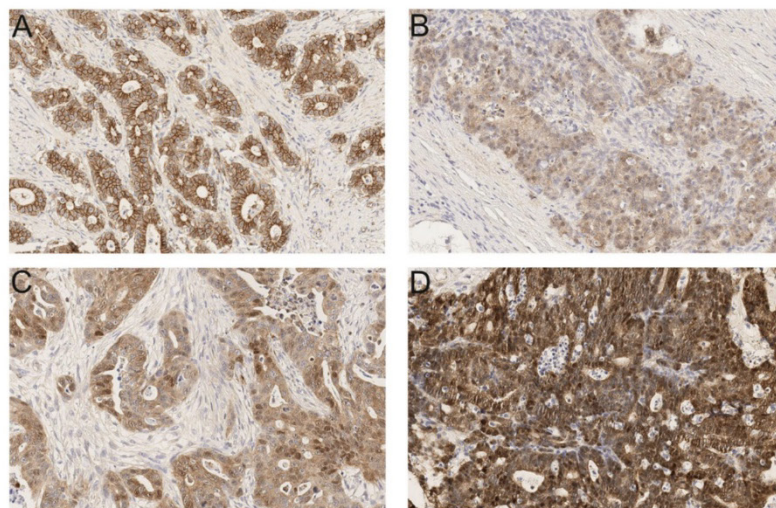


Figure 2. Scoring for nuclear translocated β -catenin in feline intestinal carcinomas (Anti- β -catenin; 20 \times). (A) Tumor with no or scattered (<5%) nuclear β -catenin staining (score 0); (B) 5–25% of tumor cells display nuclear positivity for β -catenin (score 1); (C) 26–50% of tumor cells display nuclear positivity (score 2); and (D) >50% of tumor cells are positive for nuclear β -catenin (score 3). For corresponding human β -catenin stainings see Figure S2.

Regarding proliferative activity, the Ki-67 index was assessed by a computer assisted algorithm. Selected regions of interest (ROI), i.e., tumor areas, were manually annotated by a trainee pathologist (T.G.). The ROI were exported as xml files and transferred into an open-source image analysis software ('QuPath version 0.2.3, <https://qupath.github.io>, University of Edinburgh, Scotland) for quantification. The default set of parameters of the algorithm was modified according to the stain contrast and intensity of the scanned images. Cell segmentation was performed using the following settings: detection image, optical density sum; requested pixel size 0.5 μ m; background radius 8 μ m; median filter radius 1 μ m; sigma 1.5 μ m; minimum cell area 10 μ m²; maximum cell area 400 μ m², threshold 0.1; and maximum background intensity 2. Cell classification (tumor cells, immune or stromal cells) was completed after training an object classifier using 'Random trees' as a machine

learning method [25]. ‘Smoothed object features’ at a 25 μm radius were added. This was to help with segmenting an image homogeneously so that the classifier performed an accurate classification. As a quality control step, the results of segmentation and correct cell classification were reviewed by a trainee pathologist (T.G.). Finally, the Ki-67 proliferation index was calculated exclusively within the class “tumor cells” as the percentage of cells with positive Ki-67 immunostaining and was scored as follows: <5% (0); 5–30% (1); 31–50% (2); 51–80% (3); and >80% (4).

2.1.4. Sanger Sequencing of Feline *CTNNB1* Exon 2

In order to elucidate the relevance of feline *CTNNB1* exon 2 alterations in intestinal carcinogenesis we established a Sanger sequencing protocol for feline *CTNNB1* gene exon 2 encoding β -catenin. In a first step, we compared and aligned the human (ENST00000349496.11, NM_001904.4, hg19) and feline DNA-sequences of *CTNNB1* (ENSFCAT0000003470.6, Felis_catus_9.0) to identify the corresponding regions of interest in the feline sequence. Human *CTNNB1* exon 3 is known to include a hotspot region of frequent mutations in various cancer entities, e.g., liver, stomach, and colorectal cancer [26]. Therefore, by comparing the two sequences, we identified feline *CTNNB1* exon 2 as homologous to the human nucleotide sequence of exon 3. According to this, a specific primer pair, 5'-AGCTGATCTGATGGAAGTGGAC-3' (forward) and 5'-ACACCCCTTACCAGCCACTTG-3' (reverse), which amplifies a 237-bp product encompassing feline *CTNNB1* exon 2, was designed. This primer pair was previously established and validated in a pre-study of feline fibrosarcoma ($n = 5$) using tumor samples and matching normal tissue samples. In brief, the DNA was extracted from areas of interest on FFPE sections (tumor tissue and/or normal tissue) by means of a Maxwell[®] RSC Blood DNA Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer’s protocol. DNA concentration was afterwards fluorimetrically measured by using a Qubit 4.0 system and the Qubit DNA high sensitivity Assay (both: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For amplification of the region of interest (feline *CTNNB1* gene, exon 2) 10–20 ng of DNA was used as input for the polymerase chain reaction (PCR). PCR was performed with AmpliTaq Gold polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in an Eppendorf Mastercycler[®] Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) with an annealing temperature of 60 °C. Subsequently, the amplification of tumor samples and negative control (non-template control) was validated using agarose gel electrophoresis and visualization on an Amersham Imager 680 detection system (General Electric Company Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). For purification, the PCR products were digested using ExoSAP nuclease (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) for 15 min at 37 °C followed by inhibition of the enzyme at 80 °C for 10 min in an Eppendorf Mastercycler[®]. Sanger sequencing was performed using the BigDye v1.1 Terminator Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer’s protocol in an Eppendorf Mastercycler[®]. For capillary electrophoresis the sequencing product was purified using the ZR DNA Sequencing Clean-up Kit[™] (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Germany) and loaded on an ABS/Hitachi 3130 genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After sequencing, electropherograms of each tumor sample and corresponding normal tissue were visually analyzed for the occurrence of mutations.

In this study, eleven cases positive for nuclear β -catenin (score 1–3) and containing a sufficient quantity of tumor cells (>30% tumor cell content) were selected for molecular analysis of the feline β -catenin gene exon 2 according to the method described above. Healthy intestinal mucosa from the same animals ($n = 7$) and from other animals ($n = 2$) was used as a negative control in order to confirm the native sequence of feline *CTNNB1*.

2.2. Human Specimen

For comparative purposes, human CRC specimens from the diagnostic archive of the Institute of Pathology of the Technical University of Munich were evaluated. The use of

human tissue was approved by the local ethics committee of the Technical University of Munich/Klinikum Rechts der Isar (reference number: 506/17 s).

2.3. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software version 27.0.1.0 (SPSS Institute, Chicago, IL, USA). Associations between more than two samples (i.e., WHO subtypes) and the assessed histological features (grade; cumulative score of invasiveness; vascular, lymphatic, and perineural invasion; lymph node metastasis; tumor budding; inflammation; scirrhous reaction; mucinous component; osseous metaplasia; mucosal ulceration; proliferation (MC, Ki-67); and β -catenin translocation) were examined via a Kruskal–Wallis test for nonnormally distributed parameters and a Bonferroni-adjusted post-hoc analysis. Trends between two samples (i.e., grades, tumor localization) were tested via a Mann–Whitney U test. A p value < 0.05 was considered statistically significant for all data sets.

3. Results

3.1. Tumor Site and Frequency

Histomorphological evaluation showed that the majority of examined feline intestinal carcinoma (33/49 cases, 67.3%) was located in the large intestine, whereas 16/49 cases (32.7%) appeared in the small intestine. Due to the striking morphologic similarity with human intestinal neoplasias, we decided to also include small intestinal tumors in the feline study set. In humans, small intestinal neoplasms are rare compared to colonic adenocarcinoma but the subtypes resemble the colonic classification [27].

3.2. Distribution of Histopathological Subtypes of the Feline Intestinal Tumor Cohort

Feline intestinal carcinomas closely resembled human WHO subtypes on a histomorphological level (Figure 3). Of the 16 small intestinal tumors, 12 were classified as ANOS (75%), two as MAC (12.5%), one as SAC (6.3%) and one as MPC (6.3%). Of the 33 tumors of the colon and rectum, 17 were classified as ANOS (51.5%), 12 as SAC (36.4%), 3 as MAC (9.1%), and 1 as SRCC (3%). Overall, ANOS was the most common histological subtype in cats (59.2%) followed by SAC (26.5%). MAC comprised 10.2%, and MPC and SRCC 2% of cases, respectively (Table 1). Other human WHO subtypes, including adenoma-like adenocarcinoma, medullary adenocarcinoma, adenosquamous carcinoma, undifferentiated carcinoma, and carcinoma with sarcomatoid components, were not identified in the investigated feline tumor set.

3.3. Histopathological Features of Feline Intestinal Tumor Subtypes

The majority of small intestinal carcinomas were of high grade (14/16; 87.5%). A mucinous component was found in 10/16 cases (62.5%). Vascular invasion was present in 5/16 cases (31.3%), perineural invasion in 3/16 cases (18.8%) and lymphatic invasion in 9/16 cases (56.3%). Mesenteric lymph nodes were available in 5/16 cases and metastasis was present in 2 of those 5 cases. Serosal infiltration was present in 8/16 cases (50%). Invasiveness was high (score 3) in 5/16 cases (31.3%) and low (score 0) in 3/16 cases (18.8%). Inflammation was mild in 12.5%, moderate in 50% and severe in 37.5% of cases. Mucosal ulceration was present in 13/16 cases (81.3%). A scirrhous reaction was found in 11/16 cases (68.8%). No osseous metaplasia was present. The number of mitotic figures ranged from 1 to 17, mean (\pm SD) number of mitoses was 6.88 (\pm 4.573) and the median was 5.5. All small intestinal carcinomas were of the highest budding grade (Bd3).

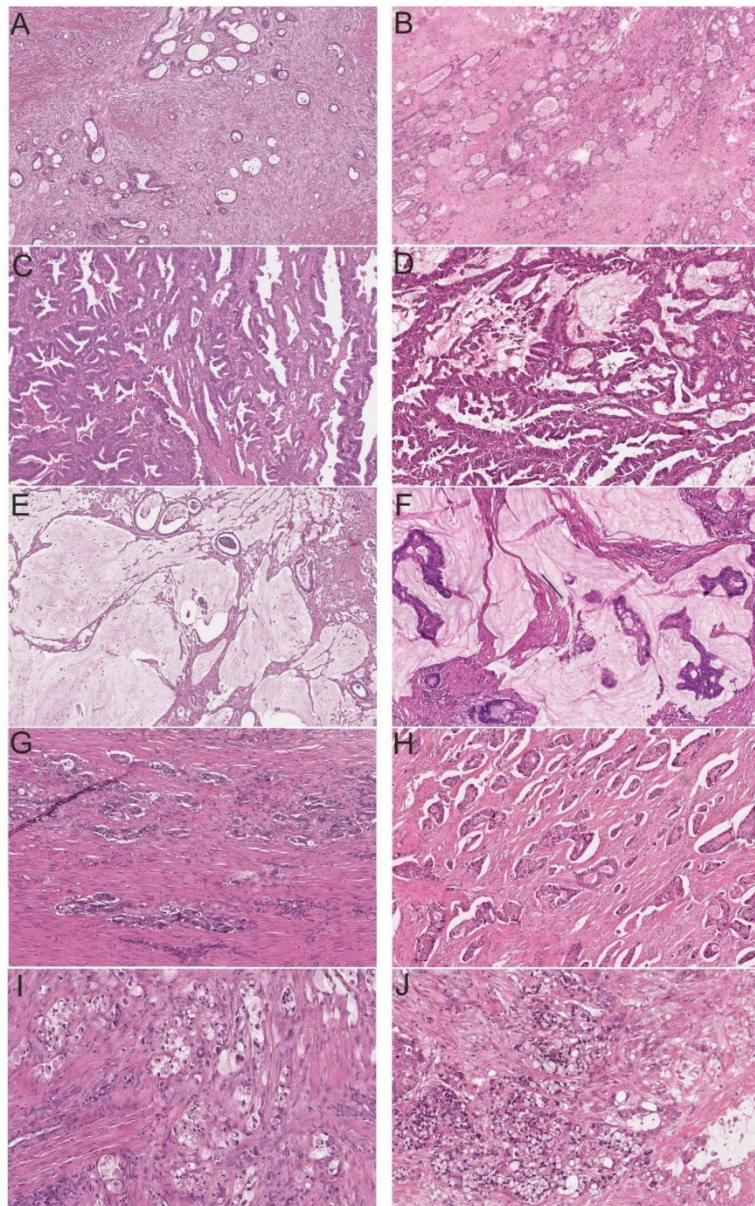


Figure 3. Feline intestinal carcinomas (**left**) closely resemble human WHO subtypes (**right**) (H&E). (**A**) Feline colonic adenocarcinoma not otherwise specified (ANOS, 8×); (**B**) Human colonic ANOS (8×); (**C**) Feline colonic serrated adenocarcinoma (SAC, 8×); (**D**) Human colonic SAC (8×); (**E**) Feline small intestinal mucinous adenocarcinoma (MAC, 8×); (**F**) Human colonic MAC (8×); (**G**) Feline small intestinal micropapillary carcinoma (MPC, 8×); (**H**) Human colonic MPC (8×); (**I**) Feline colonic signet-ring cell carcinoma (SRCC, 20×); and (**J**) Human colonic SRCC (20×).

Table 1. Distribution of histological WHO subtypes of feline intestinal carcinomas.

Cohort	Subtype	<i>n</i>	% of Total
Histological Subtypes (Overall Cohort, <i>n</i> = 49)	ANOS	29	59.18
	SAC	13	26.53
	MAC	5	10.20
	MPC	1	2.04
	SRCC	1	2.04
Histological Subtype (Small Intestinal, <i>n</i> = 16)	ANOS	12	75.00
	SAC	1	6.25
	MAC	2	12.5
	MPC	1	6.25
Histological Subtype (Colonic, <i>n</i> = 33)	ANOS	17	51.52
	SAC	12	36.36
	MAC	3	9.09
	SRCC	1	3.03

ANOS = adenocarcinoma not otherwise specified; SAC = serrated adenocarcinoma; MAC = mucinous adenocarcinoma; MPC = micropapillary carcinoma; SRCC = signet-ring cell carcinoma.

Regarding colonic carcinomas, 54.5% were of low grade and 45.5% of high grade. A mucinous component was identified in 22/33 cases (66.7%). Vascular invasion was present in 13/33 cases (39.4%), perineural invasion in 13/33 cases (39.4%) and lymphatic invasion in 11/33 cases (33.3%). Lymph node metastasis was present in 11 of 15 (73.3%) submitted lymph node samples. Inflammation was mild in 60.6% (20/33), moderate in 15.2% (5/33) and severe in 24.2% (8/33) of the colonic carcinomas. The majority of colonic carcinomas had a scirrhous component (28/33; 84.8%) and osseous metaplasia was present in 7/33 cases (21.2%). The number of mitoses per 10 hpf ranged from 0 to 37, the mean number was 7.42 (\pm 7.87), and the median was 6. The tumor budding status of colonic carcinomas was generally high (84.3% Bd3).

Overall, 20 intestinal tumors were classified as low grade (40.2%) and 29 as high grade (59.8%). Low grade tumors grew significantly less invasive than high grade tumors ($p = 0.025$). A mucinous component was present in 32/49 cases (65.3%) of the investigated neoplasms. Vascular invasion was present in 36.7% ($p = 0.137$), perineural invasion in 32.7% ($p = 0.527$) and lymphatic invasion in 40.8% ($p = 0.141$) of all intestinal carcinomas. Metastases were present in 13 of 20 cases with available lymph nodes. Intestinal tumors penetrated the serosa in 27/49 cases. Mucosal ulceration was present in 37/49 cases (75.5%) (Figure 4). In 44.9% (22/49) of cases inflammation of the tumor area was mild and composed of a mixed inflammatory cell infiltrate. A scirrhous reaction was present in 39/49 (79.6%) and osseous metaplasia in 7/49 (14.3%) cases. In general, the feline tumor budding status was remarkably high (44/49 Bd3, 89.8%). Bd3 tumors had a significantly higher cumulative score of invasiveness ($p = 0.006$) and invaded blood ($p = 0.205$) and lymphatic vessels ($p = 0.152$) more frequently. For the overall cohort, statistical analysis revealed a significant difference between the WHO subtypes regarding the feature invasiveness, represented by a cumulative score of invasiveness ($p = 0.021$). Feline serrated adenocarcinomas grew significantly less invasive than ANOS ($p = 0.014$) (Figure 5). Concordantly, ANOS infiltrated upon the serosa more frequently than SAC ($p = 0.028$). Strikingly, feline intestinal carcinomas generally exhibited an extremely dissociative and aggressively infiltrative growth pattern. For all the other aforementioned criteria no significant trends with regard to the specific histological subtypes could be determined. Detailed information on the relation between histological subtypes and the assessed histological and molecular features of the overall cohort is provided in Table S4.

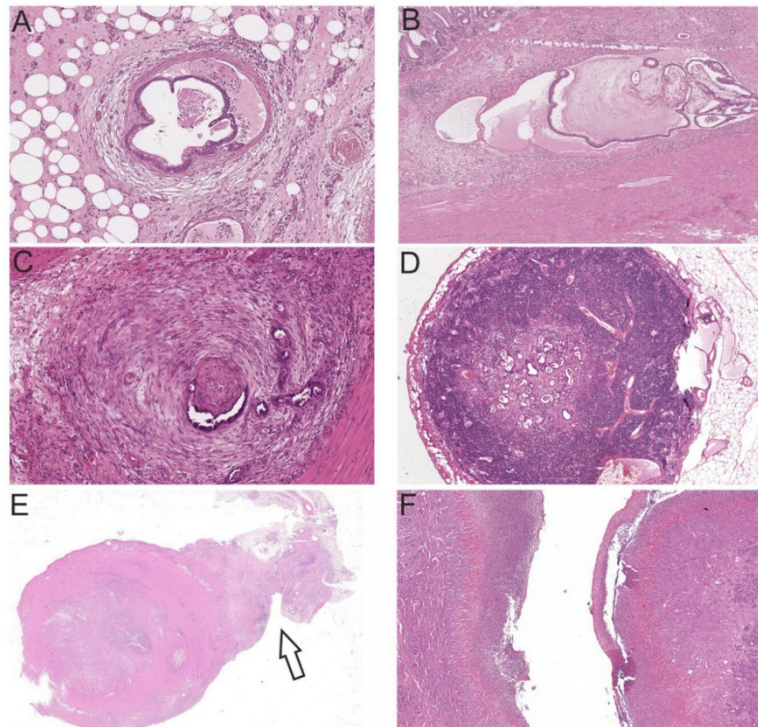


Figure 4. Characteristic malignancy features of feline intestinal tumors (H&E). (A) Vascular invasion (10×); (B) Lymphangiosis carcinomatosa (4×); (C) Perineural invasion (10×); (D) Lymph node metastasis (4×); (E) Serosal invasion, arrow (1×); and (F) Mucosal ulceration (4×).

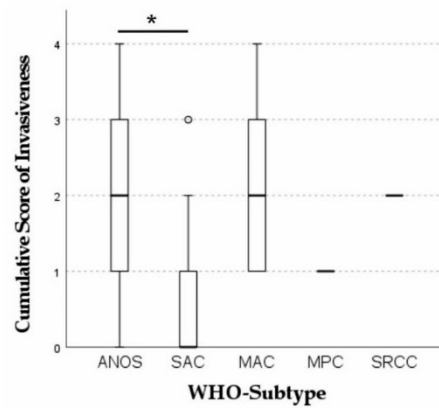


Figure 5. Kruskal–Wallis test of WHO subtypes regarding invasiveness. For the overall cohort, statistical analysis revealed a significant difference between the WHO subtypes regarding the feature invasiveness, represented by a cumulative score of invasiveness (vascular (1), perineural (1), lymphatic (1) and serosal invasion (1), max. score of 4). ($p = 0.021$). The score of invasiveness was significantly higher for ANOS than for SAC ($* p = 0.014$).

3.4. Immunohistochemical Features of the Feline Intestinal Tumor Cohort

Of the 16 small intestinal tumors, 93.8% showed no or scattered nuclear translocation of β -catenin (score 0). Nuclear translocation in 5–25% of tumor cells (score 1) was present in one small intestinal ANOS (6.3%). The 33 colonic carcinomas were positive for nuclear β -catenin to various degrees (69.7% score 0; 24.4% score 1; 3% score 3 or 4, respectively). Out of eight colonic tumors with a score of one, five were of the subtype ANOS, two were SAC and one was MAC. One colonic SAC was a score 2 and one colonic ANOS was a score 3. Taken together, the majority of the examined feline tumors displayed no or scattered nuclear translocation of β -catenin (score 0; 38/49 cases; 77.6%). Nine tumors were a score 1 (18.4%), one colonic tumor a score 2 (2%) and one a score of 3, respectively.

Tumor proliferation (Ki-67) did not differ statistically significant between the histological subtypes ($p = 0.359$) or grades ($p = 0.26$).

3.5. β -Catenin Gene Mutations in Exon 2 of Feline *CTNNB1*

For 11 tumor samples, which immunohistochemically displayed nuclear translocation of β -catenin (score 1, 2 or 3), Sanger sequencing identified somatic missense mutations in exon 2 of the feline *CTNNB1* gene in 4 colonic tumors (case 14: colonic ANOS score 1; case 20: colonic ANOS score 3; case 22: colonic ANOS score 1; case 31 colonic SAC score 1; 36.4% of all samples). Three of these four mutations were of somatic origin, and in none of the samples germline mutations were detected in exon 2 of the *CTNNB1* gene. In case 20, no matching physiological tissue of the same animal was available, thus, it could not be determined if the mutation was of somatic or of germline origin in this specific case. All identified mutations were exclusively heterozygous, and the mutational spectrum comprised a p.S37F (c.110C>T) (case 14), a p.D32G (c.95A>G) (case 20), a p.D32N (c.94G>A) (case 22), and a p.G34R (c.100G>A) (case 31) mutation (Figure 6). For all of these, an orthologous mutation is known in various human cancers, e.g., CRC, liver and stomach cancer [26]. In the remaining seven samples, a wildtype sequence of *CTNNB1* was identified either exclusively in the tumor tissue ($n = 3$) or in the tumor tissue and normal tissue ($n = 4$). Amplification status of *CTNNB1* could not be determined by Sanger sequencing.

3.6. Comparison of Feline Small Intestinal and Colonic Neoplasias

Small intestinal carcinomas were more often of high grade than colonic carcinomas ($p = 0.005$). Osseous metaplasia was present in the colonic, but not in the small intestinal carcinomas ($p = 0.049$). Nuclear translocation of the β -catenin was proved in one small intestinal ANOS (score 1), but visible to various degrees in 10 colonic tumors ($p = 0.058$). Somatic mutations of *CTNNB1* were exclusively detected in colonic carcinomas ($p = 0.15$). Inflammatory cell infiltration of the neoplastic area appeared to be mild in the majority of colonic cases and moderate to severe in the majority of small intestinal cases ($p = 0.12$). For all other assessed criteria, no statistically significant differences between the small intestinal and colonic carcinomas could be determined.

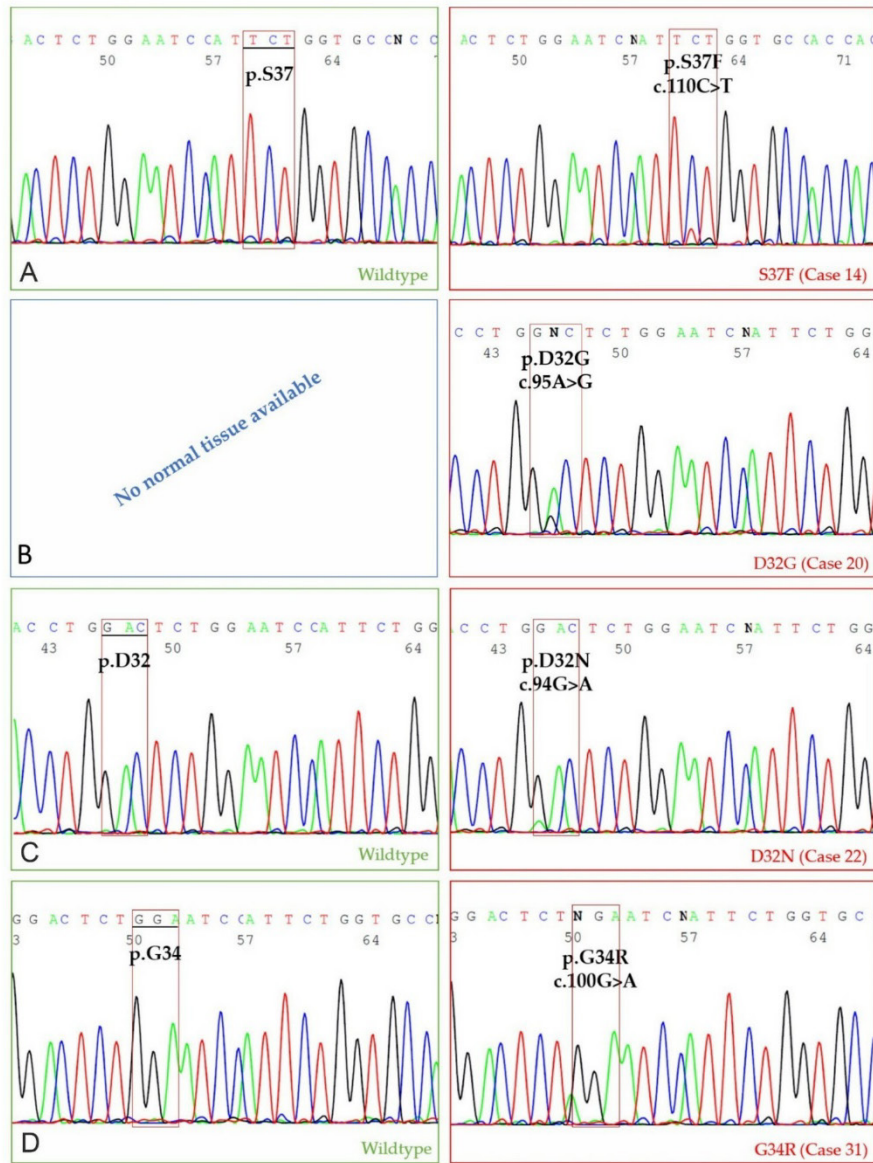


Figure 6. Four distinct somatic missense mutations were detected, each of them in a different case. DNA forward sequences; green: wildtype sequence of normal intestinal tissue ($n = 3$); red: tumor Table S4. (A) Cytosine (C) is substituted by Thymine (T), resulting in a missense mutation leading to a replacement of Serine (S) by Phenylalanine (F) on the protein level (colonic ANOS; β -catenin score 1); (B) Adenosine (A) is substituted by Guanin (G) resulting in a missense mutation leading to a replacement of Aspartic acid (D) by Glycine (G) (colonic ANOS; score 3). For case 20, no normal tissue was available; (C) Guanin (G) is substituted by Adenosine (A) resulting in a replacement of Aspartic acid (D) by Asparagine (N) (colonic ANOS, score 1); (D) Guanin (G) is substituted by Adenosine (A) resulting in a replacement of Glycine (G) by Arginine (R) (colonic SAC, score 1).

4. Discussion

The most striking morphological feature of the investigated and described feline cohort was an extremely high tumor budding activity related to a markedly dissociative tumor growth. Since the WHO criteria for human CRC was reclassified in 2019 and tumor budding was added, it is now recognized as a major grading criterion and a highly relevant and independent prognostic factor [17,19] that is generally considered to be a stage-independent predictor of lymph node metastasis in pT1 CRC and of survival in stage II CRC [18]. Tumor budding strongly impacts on all survival parameters and regarding its prognostic significance, it even outperforms WHO grade [17]. This study demonstrates a high budding status in feline intestinal carcinomas (89.8% Bd3) compared to human CRC (20% Bd3) [17]. To the authors' knowledge, no other veterinary studies evaluate feline tumor budding, and further research to establish prognostic data is imperative.

Although many GEMMs are available, researchers frequently face the problem that induced intestinal neoplasms of mice lack the invasive features characteristic for late-stage CRC, e.g., tumor budding. There are orthotopic mouse xenograft models which show tumor budding that are morphologically and immunohistochemically close to what is seen in human CRC; however, these models often have an immunocompromised background and thus are limited in their relevance to the human situation [28,29]. Moreover, the very limited availability of *in vivo* budding models to date is another drawback [29]. Our study shows the capability of spontaneous feline intestinal carcinomas to serve as an immunocompetent model for elucidating the intestinal tumor budding mechanisms of CRC.

Due to these similarities and the potential use of spontaneously arising feline intestinal tumors for comparative research trials of human CRC, we decided on categorizing feline intestinal tumors according to the human WHO classification of 2019 [19]. Human WHO subtypes were proven to be clinically relevant with a strong impact on overall survival (OS), disease-free survival (DFS), and disease-specific survival (DSS) ($p < 0.001$) and a clear association with WHO grade and budding status. For example, MPC and SRCC are very aggressive subtypes connected to a poor survival prognosis, whereas SAC mostly does not invade perineural or venous and is connected to a better prognosis considering the CRC subtypes [17].

The feline cohort was compared to a large-scale cohort of human colorectal carcinomas recently characterized and published by Jesinghaus et al. in 2021. Most human CRCs are ANOS, defined by an invasive growth pattern breaking the line of the lamina muscularis mucosae and invading the submucosa; a feature which was present in all included feline intestinal tumors. Overall, ANOS was the most common histological subtype (59.2%) in cats, similar to the human cohort (62.7%) [17]. In a recent study of feline intestinal carcinomas, tubular adenocarcinoma was determined to be the most common tumor type (33/50 cases; 66%), morphologically comparable to ANOS [12]. The second most common colonic subtype in the feline cohort was SAC, which was overrepresented compared to human CRCs (8.7%) [17]. Consistent with this, Uneyama et al. found that feline colorectal carcinomas frequently showed glandular serration, and they detected three *KRAS* mutations in seven cases of feline colorectal epithelial tumors [12]. Presuming that *KRAS* gene mutations are frequently involved in human CRC development and particularly in the 'serrated pathway', this pathway may play an important role in feline intestinal carcinogenesis, as it does for human serrated adenocarcinomas [20,30–32]. Although we unfortunately lack survival data for our described feline study set, we were able to show that feline SAC displayed less invasive growth compared to other subtypes, compatible with the rather favorable prognosis of human SAC [17].

A lack of species-specific investigation tools, especially of molecular pathological markers, constitutes a significant challenge in the use of companion animal cancers as human tumor models (e.g., DNA primers). Commercially available and formalin-approved antibodies for cats or dogs are not as readily available as for human and rodent tissue [7] and molecular methods aiming at the detection of specific somatic or germline mutations

are infrequently used in companion animal studies. We successfully designed a DNA primer pair appropriate for amplification of the feline *CTNNB1* gene exon 2, which is homologous to the nucleotide sequence of human *CTNNB1* exon 3 and contains a hotspot region of frequent mutations for various human cancers including CRC [26]. Because of this homology, *CTNNB1* mutations located in this DNA-region are most likely to cause similar effects in both species.

Mutations activating the canonical WNT/ β -catenin signaling pathway are very frequently involved in the ‘classical pathway’ of human colorectal carcinogenesis [20]. β -catenin is a highly conserved protein, part of the WNT signaling pathway and plays an important role in cell-adhesion [33]. Alterations of *CTNNB1* that result in disturbed degradation of β -catenin lead to its cytoplasmic accumulation and subsequent translocation into the nucleus, where it acts as an oncogenic player enhancing the expression of several downstream target genes, e.g., *CCND1* (CYCLIN D1) [34,35], *MYC* [20,35,36], and *AXIN2* [35]. On the one hand, stabilizing homozygous *CTNNB1* mutations play a crucial role, especially in human CRC associated with Lynch syndrome [21]. On the other hand, *CTNNB1* mutations are less often (5% non-hypermuted (nHM) CRC; 7% hypermutated (HM) CRC) involved in sporadic human colorectal carcinogenesis than *APC* (Adenomatous polyposis coli) mutations (81% nHM; 53% HM CRC) [20].

From a comparative point of view, in intestinal neoplasms in dogs, *CTNNB1* mutations were proven to be more often causative than *APC* mutations, with *CTNNB1* being mutated in >60% of canine colorectal tumors [22]. Several studies also provide evidence of nuclear β -catenin translocation and accumulation in canine intestinal adenomas and carcinomas [37–39].

Currently, very little is known about the genomic landscape of companion animal cancers [40], and particularly of feline cancers. Because β -catenin score did not correlate with malignancy, Uneyama et al. concluded from their IHC results that dysregulated β -catenin is likely not an important player in feline intestinal tumorigenesis; however, accumulation of β -catenin was evident in 60% of their cases [12]. Our immunohistochemical examination of feline intestinal carcinomas (22.5% of cases positive for nuclear β -catenin) as well as the high expression of active β -catenin in feline mammary tumors compared to healthy tissue [41], prompted us to further investigate the role of this key protein in the entity of feline intestinal cancer.

For the first time, Sanger sequencing of feline *CTNNB1* exon 2 was performed and revealed four somatic missense mutations identical with pathogenic mutations in humans [26]. Human codons most frequently displaying mutations related to CRC are, namely, codons 32, 33, 34, 37, 41, and 45 [26]. Canine mutations were found in codons 32, 34, and 45 [22]. In our study, feline mutations were located at codons 32, 34 and 37, consistent with mutations of human and canine intestinal tumorigenesis. As a result, we strongly challenge the finding that dysregulated WNT/ β -catenin signaling is not involved in feline intestinal carcinogenesis.

APC loss-of-function mutations leading to an impacted degradation of β -catenin can also lead to an increase of cytoplasmic and nuclear β -catenin [20]. This could be a possible explanation for the seven cases, which displayed nuclear β -catenin positivity but did not show sequential alterations of *CTNNB1*. Future investigations conducting feline *APC* sequencing (i.e., panel or whole exome sequencing) and including a larger cohort size are required to finally clarify if *APC* mutations also play a role in feline intestinal tumorigenesis. Nevertheless, genomic amplification of the *CTNNB1* gene, which might also be a mechanism for overexpression of the protein in cancer in humans, cannot completely be excluded [42].

The majority (93.8%) of small intestinal tumors displayed no relevant nuclear β -catenin translocation and the only tumor showing a nuclear IHC-signal did not harbor a *CTNNB1* mutation. In contrast to that, colonic tumors displayed various degrees of positivity for nuclear β -catenin ($n = 10$) and mutations of *CTNNB1* ($n = 4$). Although the feline small and large intestinal tumors appear to have histomorphological similarities,

small intestinal tumors were almost exclusively of high grade and high tumor budding status. Future investigations are needed to further elucidate the mutational spectrum of feline small intestinal tumors.

A first step has been taken, but much work remains to be done. In order to beneficially integrate the feline model into human CRC research, further investigation of feline cancers' genetics, genome-wide studies as well as genome annotation are imperative. The final ideal of comparative oncology is to include companion animals (pets) with comparative cancer diseases in clinical trials. Educating and informing pet owners and considering ethical standards is a major point here [40].

Our data provides an accurate histological classification system for feline intestinal tumors and a basis for comparative oncology [40] studies by harmonizing histological classification and conducting molecular examination on spontaneously arising intestinal tumors in pet cats. The results indicate that feline intestinal carcinomas constitute a valuable and promising in vivo model for human CRC, worthy of further characterization.

5. Conclusions

In conclusion, the present study evaluates histopathological features and patterns of feline intestinal tumors. It demonstrates two main reasons for the suitability of feline intestinal tumors as a valid spontaneous in vivo model for late-stage human CRC: (1) Feline intestinal carcinomas resemble human subtypes and present with an invasive growth and high tumor budding activity, (2) *CTNNB1* mutations are present in feline intestinal carcinomas, as has been reported in human and canine intestinal tumorigenesis. Sharing two important molecular alterations, namely *KRAS* [12] and *CTNNB1* mutations involved in intestinal carcinogenesis, cats are a valuable model for late-stage sporadic human CRC.

This study provides a solid foundation for the comparison of feline and human CRC, indicates the need to review the available classification schemes for feline intestinal cancers and paves the way for future comparative oncology studies.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13235941/s1>, Figure S1: tumor budding (TB) in the invasive front of human CRC, Figure S2: corresponding human β -catenin phenotypes to Figure 2, Table S1: feline cohort SPSS dataset, Table S2: feline cohort information (localization, specimen, breed, sex, age), Table S3: primary antibodies and IHC protocols, Table S4: relationship between histological subtypes and histological and molecular features.

Author Contributions: Conceptualization of the study, T.G., N.P., W.W., K.M., M.J. and K.S.; resources, U.S., H.A.-L., N.P., W.W., M.J. and K.S.; methodology, T.G., F.S., S.R.J.S., N.P., M.J. and K.S.; evaluation of slides, results, T.G., D.D., C.M., U.S., N.P., M.J. and K.S.; critical discussion, T.G., D.D., C.M., U.S., H.A.-L., S.R.J.S., N.P., M.J., K.M. and K.S.; writing—original draft preparation, T.G.; writing—review and editing, T.G., F.S., D.D., U.S., H.A.-L., S.R.J.S., N.P., K.M. and K.S.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: T.G. received a scholarship from the Cusanuswerk, Bischöfliche Studienförderung, Bonn, Germany. S.R.J.S. is supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG, SFB1371-395357507). K.S. is supported by the Germany Research Foundation (DFG, SFB1335-360372040) project Z01.

Institutional Review Board Statement: The use of human tissue was approved by the local ethics committee of the Technical University of Munich/Klinikum Rechts der Isar (reference number: 506/17 s).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data of the results presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank O. Seelbach, A. Jacob, M. Mielke and U. Mühlthaler for their outstanding technical support.

Conflicts of Interest: LABOKLIN GmbH & Co. KG offers histopathological service for routine diagnostics. T.G. presented preliminary parts of this study at the 4th Cutting Edge Pathology Congress 2021. W.W. has attended Advisory Boards and served as speaker for Roche, MSD, BMS, AstraZeneca, Pfizer, Merck, Lilly, Boehringer, Novartis, Takeda, Bayer, Amgen, Astellas, Eisai, Illumina, Siemens, Agilent, ADC, GSK, and Molecular Health. W.W. receives research funding from Roche, MSD, BMS and AstraZeneca. N.P. has attended Advisory Boards and served as speaker for Roche, BMS, AstraZeneca, Lilly, Novartis, Bayer, Illumina, and Thermo Fisher Scientific. K.S. is consultant for Roche Pharma AG, member of the advisory board of TRIMT GmbH and has filed a patent on a radiopharmaceutical. All other authors declare no conflicts of interest.

References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#)
- Washington, M.K.; Powell, A.E.; Sullivan, R.; Sundberg, J.P.; Wright, N.; Coffey, R.J.; Dove, W.F. Pathology of rodent models of intestinal cancer: Progress report and recommendations. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 705–717. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jackstadt, R.; Sansom, O.J. Mouse models of intestinal cancer. *J. Pathol.* **2016**, *238*, 141–151. [\[CrossRef\]](#)
- Taketo, M.M.; Edelman, W. Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 780–798. [\[CrossRef\]](#)
- McIntyre, R.E.; Buczacki, S.J.; Arends, M.J.; Adams, D.J. Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. *Bioessays* **2015**, *37*, 909–920. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- McIntyre, R.E.; van der Weyden, L.; Adams, D.J. Cancer gene discovery in the mouse. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2012**, *22*, 14–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vail, D.M.; MacEwen, E.G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investig.* **2000**, *18*, 781–792. [\[CrossRef\]](#)
- Schwittlick, U.; Becker, S.; Aupperle-Lellbach, H. Vorkommen und Lokalisation von gastrointestinalen Neoplasien bei 293 Katzen. *Kleintiermedizin* **2020**, *6*, 250–253.
- Rissetto, K.; Villamil, J.A.; Selting, K.A.; Tyler, J.; Henry, C.J. Recent trends in feline intestinal neoplasia: An epidemiologic study of 1129 cases in the veterinary medical database from 1964 to 2004. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **2011**, *47*, 28–36. [\[CrossRef\]](#)
- Bonfanti, U.; Bertazzolo, W.; Bottero, E.; De Lorenzi, D.; Maronato, L.; Masserdotti, C.; Zatelli, A.; Zini, E. Diagnostic value of cytologic examination of gastrointestinal tract tumors in dogs and cats: 83 cases (2001–2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2006**, *229*, 1130–1133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Turk, M.A.; Gallina, A.M.; Russell, T.S. Nonhematopoietic gastrointestinal neoplasia in cats: A retrospective study of 44 cases. *Vet. Pathol.* **1981**, *18*, 614–620. [\[CrossRef\]](#)
- Uneyama, M.; Chambers, J.K.; Nakashima, K.; Uchida, K.; Nakayama, H. Histological Classification and Immunohistochemical Study of Feline Colorectal Epithelial Tumors. *Vet. Pathol.* **2021**, *58*, 305–314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Patnaik, A.K.; Liu, S.K.; Johnson, G.F. Feline intestinal adenocarcinoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Vet. Pathol.* **1976**, *13*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
- Manuali, E.; Forte, C.; Vichi, G.; Genovese, D.A.; Mancini, D.; De Leo, A.A.P.; Cavicchioli, L.; Pierucci, P.; Zappulli, V. Tumours in European Shorthair cats: A retrospective study of 680 cases. *J. Feline Med. Surg.* **2020**, *22*, 1095–1102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Slawiński, M.J.; Mauldin, G.E.; Mauldin, G.N.; Patnaik, A.K. Malignant colonic neoplasia in cats: 46 cases (1990–1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1997**, *211*, 878–881.
- Hume, D.Z.; Solomon, J.A.; Weisse, C.W. Palliative use of a stent for colonic obstruction caused by adenocarcinoma in two cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2006**, *228*, 392–396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jesinghaus, M.; Schmitt, M.; Lang, C.; Reiser, M.; Scheiter, A.; Konukiewitz, B.; Steiger, K.; Silva, M.; Tschurtschenthaler, M.; Lange, S.; et al. Morphology Matters: A Critical Reappraisal of the Clinical Relevance of Morphologic Criteria From the 2019 WHO Classification in a Large Colorectal Cancer Cohort Comprising 1004 Cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **2021**, *45*, 969–978. [\[CrossRef\]](#)
- Lugli, A.; Kirsch, R.; Ajioka, Y.; Bosman, F.; Cathomas, G.; Dawson, H.; El Zimaity, H.; Fléjou, J.F.; Hansen, T.P.; Hartmann, A.; et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod. Pathol.* **2017**, *30*, 1299–1311. [\[CrossRef\]](#)
- Nagtegaal, I.; Arends, M.; Odze, R. Tumours of the Colon and Rectum: WHO Classification of Tumours of the Colon and Rectum, TNM Staging of Carcinomas of the Colon and Rectum and the Introduction. In *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System*; IARC Press: Geneva, Switzerland, 2019; pp. 157–187.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **2012**, *487*, 330–337. [\[CrossRef\]](#)
- Arnold, A.; Tronser, M.; Sers, C.; Ahadova, A.; Endris, V.; Mamlouk, S.; Horst, D.; Möbs, M.; Bischoff, P.; Kloor, M.; et al. The majority of β -catenin mutations in colorectal cancer is homozygous. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 1038. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, J.; Wang, T.; Sun, Y.; Feng, Y.; Kisseberth, W.C.; Henry, C.J.; Mok, I.; Lana, S.E.; Dobbin, K.; Northrup, N.; et al. Proliferative and Invasive Colorectal Tumors in Pet Dogs Provide Unique Insights into Human Colorectal Cancer. *Cancers* **2018**, *10*, 330. [\[CrossRef\]](#)

23. Gonzalez, R.S.; Huh, W.J.; Cates, J.M.; Washington, K.; Beauchamp, R.D.; Coffey, R.J.; Shi, C. Micropapillary colorectal carcinoma: Clinical, pathological and molecular properties, including evidence of epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology* **2017**, *70*, 223–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Meuten, D.J.; Moore, F.M.; George, J.W. Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize. *Vet. Pathol.* **2016**, *53*, 7–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Breiman, L. Random Forests. *Mach. Learn.* **2001**, *45*, 5–32. [[CrossRef](#)]
26. Tate, J.G.; Bamford, S.; Jubb, H.C.; Sondka, Z.; Beare, D.M.; Bindal, N.; Boutselakis, H.; Cole, C.G.; Creatore, C.; Dawson, E.; et al. COSMIC: The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D941–D947. [[CrossRef](#)]
27. Salto-Tellez, M.; Ruge, M. Tumours of the Small Intestine and Ampulla. In *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System*; Salto-Tellez, M., Nagtegaal, I., Ruge, M., Eds.; IARC Press: Geneva, Switzerland, 2019.
28. Prall, F.; Maletzki, C.; Hühns, M.; Krohn, M.; Linnebacher, M. Colorectal carcinoma tumour budding and podia formation in the xenograft microenvironment. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Georges, L.M.C.; De Wever, O.; Galván, J.A.; Dawson, H.; Lugli, A.; Demetter, P.; Zlobec, I. Cell Line Derived Xenograft Mouse Models Are a Suitable in vivo Model for Studying Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front. Med.* **2019**, *6*, 139. [[CrossRef](#)]
30. Pai, R.K.; Bettington, M.; Srivastava, A.; Rosty, C. An update on the morphology and molecular pathology of serrated colorectal polyps and associated carcinomas. *Mod. Pathol.* **2019**, *32*, 1390–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Jass, J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* **2007**, *50*, 113–130. [[CrossRef](#)]
32. Rex, D.K.; Ahnen, D.J.; Baron, J.A.; Batts, K.P.; Burke, C.A.; Burt, R.W.; Goldblum, J.R.; Guillem, J.G.; Kahi, C.J.; Kalady, M.F.; et al. Serrated lesions of the colorectum: Review and recommendations from an expert panel. *Am. J. Gastroenterol.* **2012**, *107*, 1315–1329, quiz 1314, 1330. [[CrossRef](#)]
33. Valenta, T.; Hausmann, G.; Basler, K. The many faces and functions of β -catenin. *Embo. J.* **2012**, *31*, 2714–2736. [[CrossRef](#)]
34. Tetsu, O.; McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **1999**, *398*, 422–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Herbst, A.; Jurinovic, V.; Krebs, S.; Thieme, S.E.; Blum, H.; Göke, B.; Kolligs, F.T. Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 74. [[CrossRef](#)]
36. He, T.C.; Sparks, A.B.; Rago, C.; Hermeking, H.; Zawel, L.; da Costa, L.T.; Morin, P.J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **1998**, *281*, 1509–1512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Saito, T.; Chambers, J.K.; Nakashima, K.; Uchida, E.; Ohno, K.; Tsujimoto, H.; Uchida, K.; Nakayama, H. Histopathologic Features of Colorectal Adenoma and Adenocarcinoma Developing Within Inflammatory Polyps in Miniature Dachshunds. *Vet. Pathol.* **2018**, *55*, 654–662. [[CrossRef](#)]
38. McEntee, M.F.; Brenneman, K.A. Dysregulation of beta-catenin is common in canine sporadic colorectal tumors. *Vet. Pathol.* **1999**, *36*, 228–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Herstad, K.M.V.; Gunnes, G.; Rørtveit, R.; Kolbjørnsen, Ø.; Tran, L.; Skancke, E. Immunohistochemical expression of β -catenin, Ki67, CD3 and CD18 in canine colorectal adenomas and adenocarcinomas. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 119. [[CrossRef](#)]
40. LeBlanc, A.K.; Breen, M.; Choyke, P.; Dewhirst, M.; Fan, T.M.; Gustafson, D.L.; Helman, L.J.; Kastan, M.B.; Knapp, D.W.; Levin, W.J.; et al. Perspectives from man’s best friend: National Academy of Medicine’s Workshop on Comparative Oncology. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 324ps325. [[CrossRef](#)]
41. Sammarco, A.; Gomiero, C.; Sacchetto, R.; Boffagna, G.; Michieletto, S.; Orvieto, E.; Cavicchioli, L.; Gelain, M.E.; Ferro, S.; Patrino, M.; et al. Wnt/ β -Catenin and Hippo Pathway Deregulation in Mammary Tumors of Humans, Dogs, and Cats. *Vet. Pathol.* **2020**, *57*, 774–790. [[CrossRef](#)]
42. Suriano, G.; Vrcelj, N.; Senz, J.; Ferreira, P.; Masoudi, H.; Cox, K.; Nabais, S.; Lopes, C.; Machado, J.C.; Seruca, R.; et al. beta-catenin (CTNNB1) gene amplification: A new mechanism of protein overexpression in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **2005**, *42*, 238–246. [[CrossRef](#)]

2 Publikation II

Comparative Study of the Role of Interepithelial Mucosal Mast Cells in the Context of Intestinal Adenoma-Carcinoma Progression

Tanja Groll^{1,2,3}, Miguel Silva¹, Rim Sabrina Jahan Sarker^{1,2}, Markus Tschurtschenthaler^{4,5,6,7}, Theresa Schnalzger^{6,8}, Carolin Mogler^{1,2}, Daniela Denk^{1,2,3}, Sebastian Schölch^{9,10,11}, Barbara U. Schraml^{12,13}, Jürgen Ruland^{5,6,8}, Roland Rad^{4,5,6,14}, Dieter Saur^{4,5,6,7}, Wilko Weichert^{1,2,5}, Moritz Jesinghaus^{1,15}, Kaspar Matiasek³ and Katja Steiger^{1,2,*}

¹ Institute of Pathology, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

² Comparative Experimental Pathology (CEP), School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

³ Center for Clinical Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Pathology, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), Munich, Germany

⁴ Department of Medicine II, Klinikum Rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

⁵ German Cancer Consortium (DKTK), German Cancer Research Center (DKFZ), Partner Site Munich, Munich, Germany

⁶ TranslaTUM, Center for Translational Cancer Research, Technical University of Munich, Munich, Germany

⁷ Institute of Translational Cancer Research and Experimental Cancer Therapy, Klinikum Rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

⁸ Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

⁹ JCCU Translational Surgical Oncology (A430), German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

¹⁰ DKFZ-Hector Cancer Institute at University Medical Center Mannheim, Germany

¹¹ Department of Surgery, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

¹² Walter Brendel Centre of Experimental Medicine, University Hospital, LMU

Munich, Planegg-Martinsried, Germany

¹³ Biomedical Center (BMC), Institute for Cardiovascular Physiology and Pathophysiology, Faculty of Medicine, LMU Munich, Planegg-Martinsried, Germany

¹⁴ Institute of Molecular Oncology and Functional Genomics, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

¹⁵ Institute of Pathology, University Hospital Marburg, Marburg, Germany

Cancers (Basel), veröffentlicht.

Cancers (Basel). 2022;14, 2248. Published 2022 Apr 30.

<https://doi.org/10.3390/cancers14092248>

Article

Comparative Study of the Role of Interepithelial Mucosal Mast Cells in the Context of Intestinal Adenoma-Carcinoma Progression

Tanja Groll ^{1,2,3} , Miguel Silva ¹ , Rim Sabrina Jahan Sarker ^{1,2}, Markus Tschurtschenthaler ^{4,5,6,7} , Theresa Schnalzger ^{6,8}, Carolin Mogler ^{1,2} , Daniela Denk ^{1,2,3}, Sebastian Schölch ^{9,10,11} , Barbara U. Schraml ^{12,13}, Jürgen Ruland ^{5,6,8} , Roland Rad ^{4,5,6,14}, Dieter Saur ^{4,5,6,7}, Wilko Weichert ^{1,2,5}, Moritz Jesinghaus ^{1,15}, Kaspar Matiasek ³ and Katja Steiger ^{1,2,*} 

- ¹ Institute of Pathology, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany; tanja.groll@tum.de (T.G.); miguel.silva@tum.de (M.S.); sabrina.sarker@tum.de (R.S.J.S.); carolin.mogler@tum.de (C.M.); daniela.denk@tum.de (D.D.); wilko.weichert@tum.de (W.W.); moritz.jesinghaus@uni-marburg.de (M.J.)
- ² Comparative Experimental Pathology (CEP), School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany
- ³ Center for Clinical Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Pathology, Ludwig-Maximilians-Universitaet (LMU), 80539 Munich, Germany; kaspar.matiasek@neuropathologie.de
- ⁴ Department of Medicine II, Klinikum Rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany; markus.tschurtschenthaler@tum.de (M.T.); roland.rad@tum.de (R.R.); dieter.saur@tum.de (D.S.)
- ⁵ German Cancer Consortium (DKTK), German Cancer Research Center (DKFZ), Partner Site Munich, 81675 Munich, Germany; j.ruland@tum.de
- ⁶ TranslaTUM, Center for Translational Cancer Research, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany; theresa.schnalzger@tum.de
- ⁷ Institute of Translational Cancer Research and Experimental Cancer Therapy, Klinikum Rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany
- ⁸ Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany
- ⁹ JCCU Translational Surgical Oncology (A430), German Cancer Research Center (DKFZ), 69120 Heidelberg, Germany; s.schoelch@dkfz.de
- ¹⁰ DKFZ-Hector Cancer Institute at University Medical Center Mannheim, 68167 Mannheim, Germany
- ¹¹ Department of Surgery, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, 68167 Mannheim, Germany
- ¹² Walter Brendel Centre of Experimental Medicine, University Hospital, LMU Munich, 82152 Planegg-Martinsried, Germany; barbara.schraml@bmc.med.lmu.de
- ¹³ Biomedical Center (BMC), Institute for Cardiovascular Physiology and Pathophysiology, Faculty of Medicine, LMU Munich, 82152 Planegg-Martinsried, Germany
- ¹⁴ Institute of Molecular Oncology and Functional Genomics, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany
- ¹⁵ Institute of Pathology, University Hospital Marburg, 35043 Marburg, Germany
- * Correspondence: katja.steiger@tum.de; Tel.: +49-89-4140-6075; Fax: +49-89-4140-4865



Citation: Groll, T.; Silva, M.; Sarker, R.S.J.; Tschurtschenthaler, M.; Schnalzger, T.; Mogler, C.; Denk, D.; Schölch, S.; Schraml, B.U.; Ruland, J.; et al. Comparative Study of the Role of Interepithelial Mucosal Mast Cells in the Context of Intestinal Adenoma-Carcinoma Progression. *Cancers* **2022**, *14*, 2248. <https://doi.org/10.3390/cancers14092248>

Academic Editor: Aurélie Tchoghandjian

Received: 28 March 2022

Accepted: 27 April 2022

Published: 30 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The role of mast cells in the tumor microenvironment (TME) remains controversial but has become increasingly evident and explored as a possible therapeutic target. In this study, we investigated the underexplored mast cell heterogeneity of intestinal cancer by applying standardized mast cell subtyping during adenoma-carcinoma progression. We immunohistochemically evaluated and scored the occurrence of interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs) in tumors of frequently employed genetically engineered mouse models and in human colonic adenomas and carcinomas. We found a decrease of ieMMCs from colonic low-grade adenomas to carcinomas. Moreover, mouse models based on altered Wnt signaling showed higher ieMMC scores than models based on altered MAPK signaling. Our descriptive study indicates that ieMMCs play a special role in the molecular TME related to adenoma-carcinoma progression. Furthermore, it emphasizes the need for adequate immunohistochemical methodology and experimental setup when investigating the functional role of mast cell populations of the TME.

Abstract: Mast cells (MCs) are crucial players in the relationship between the tumor microenvironment (TME) and cancer cells and have been shown to influence angiogenesis and progression of

human colorectal cancer (CRC). However, the role of MCs in the TME is controversially discussed as either pro- or anti-tumorigenic. Genetically engineered mouse models (GEMMs) are the most frequently used *in vivo* models for human CRC research. In the murine intestine there are at least three different MC subtypes: interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs), lamina propria mucosal mast cells (lpMMCs) and connective tissue mast cells (CTMCs). Interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs) in (pre-)neoplastic intestinal formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens of mouse models (total lesions $n = 274$) and human patients ($n = 104$) were immunohistochemically identified and semiquantitatively scored. Scores were analyzed along the adenoma-carcinoma sequence in humans and 12 GEMMs of small and large intestinal cancer. The presence of ieMMCs was a common finding in intestinal adenomas and carcinomas in mice and humans. The number of ieMMCs decreased in the course of colonic adenoma-carcinoma sequence in both species ($p < 0.001$). However, this dynamic cellular state was not observed for small intestinal murine tumors. Furthermore, ieMMC scores were higher in GEMMs with altered Wnt signaling (active β -catenin) than in GEMMs with altered MAPK signaling and wildtypes (WT). In conclusion, we hypothesize that, besides stromal MCs (lpMMCs/CTMCs), particularly the ieMMC subset is important for onset and progression of intestinal neoplasia and may interact with the adjacent neoplastic epithelial cells in dependence on the molecular environment. Moreover, our study indicates the need for adequate GEMMs for the investigation of the intestinal immunologic TME.

Keywords: tumor microenvironment; colorectal cancer; interepithelial mucosal mast cells; adenoma-carcinoma sequence; human; genetically engineered mouse models

1. Introduction

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third-most frequent cancer type and the second most common cause of cancer-related deaths [1]. It is well known that mast cells (MCs) are important players in the immunologic microenvironment of intestinal tumors [2]. However, to date, their specific role in the intestinal tumor microenvironment (TME) and their contribution to the molecular intestinal carcinogenesis remain diverse and largely elusive. On one hand, there is evidence for a pro-tumorigenic (i.e., poor prognostic) role [3–6]. On the other hand, several studies describe an anti-tumorigenic (i.e., favorable prognostic) role of MCs [7,8]. Recent literature suggests evidence of a cellular crosstalk between cancer cells and MCs in the context of intestinal carcinogenesis [9–12]. Ultimately, an advanced understanding of the role of MCs in CRC will also be beneficial with regard to therapeutic options [13].

Historically, rodent MCs are divided into T-cell independent connective tissue mast cells (CTMCs) and T-cell dependent mucosal MCs (MMCs) [14–16]. Vogel et al., 2018 elaborated this classification in the context of intestinal immunopathology by further distinguishing between (smaller) interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs) and lamina propria mucosal mast cells (lpMMCs) and (larger) CTMCs. Using specific expression of murine mast cell protease 1 and 4 (MCPT1 and MCPT4) and cellular topography, it is possible to differentiate between ieMMCs and lpMMCs/CTMCs within the intestine. The authors emphasize the importance of reliably distinguishing these subtypes by means of immunohistochemistry (IHC) in order to adequately reflect the actual mast cell heterogeneity in the GI tract [17]. Mast cells are generally termed as “subepithelial inflammatory cells” of the lamina propria, located below the intestinal epithelium [18,19]. Nevertheless, it has long been known that MCs are able to migrate through the basal lamina in interepithelial spaces [20].

Previous tissue-based studies of intestinal MCs in human CRC either used no MC subtyping (histochemical stainings) [21,22] or IHC-based methodologies to subtype MCs regarding to their protease content as follows: tryptase (MC_T) [3,5,9,23]; chymase (MC_C); or tryptase and chymase (MC_{TC}) positive (+) MCs [7,8,24,25]. Indeed, some authors occasionally mention the occurrence of intestinal MCs in close proximity to the intestinal

epithelium [22], but a clear discrimination between ieMMCs and stromal MCs in human CRC has not been carried out so far.

The human intestinal carcinogenesis is generally regarded as a progressive set of events, starting from the onset of pre-malignant adenoma then developing into invasive carcinoma through the sequential acquisition of genetic alterations in tumor suppressor genes (e.g., *APC*) and oncogenes (e.g., *KRAS*) [26–28]. Genetically engineered mouse models (GEMMs) are regarded as the gold standard for the in vivo study of CRC due to the high similarity of disease expression and molecular features between mice and humans [29–31].

Considering the dominating role of mice as experimentally induced in vivo models of human CRC, we standardized MC classification by subdividing intestinal MC populations as suggested by Vogel et al., 2018 [17] in order to ensure inter-species comparison. An immunohistological, descriptive, semiquantitative scoring method was established to investigate the relevance of MCs, specifically the understudied ieMMC population, in different groups of GEMMs as well as in human CRC patients. Here we investigated the dynamics of ieMMC populations across the adenoma-carcinoma progression [26,27,32] in mice and humans. Furthermore, we analyzed potential differences in the occurrence of ieMMCs in a variety of GEMMs of small and large intestinal neoplasia. If the term “murine” is used in this article, it will refer to the species mouse (*Mus musculus*).

2. Materials and Methods

2.1. Archival Mouse Tissue Cohorts

In total, 151 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks were retrospectively analyzed, originating from different GEMMs generated between the years 2009 and 2021. In some cases, blocks contained more than one neoplastic lesion (Swiss rolls), thus overall $n = 274$ murine lesions were investigated. All FFPE samples were obtained from the archive of the Comparative Experimental Pathology (CEP) unit at the Institute of Pathology, Technical University of Munich (TUM), Munich, Germany. FFPE blocks were stored in a cool, dark, and dry archive cabinet in order to avoid a loss of antigenicity. The mouse models assessed in this study ($n = 12$) were either of wildtype (WT) or expressed genetic alterations in one or more genes which affect either a single or various oncogenic pathways commonly altered in CRC [33–39]. Therefore, they were used as in vivo models for the investigation of intestinal carcinogenesis in previous experiments. Models were grouped according to: (1.) their genetic alterations; (2.) mode of tumor induction (Table S1).

Genetically Engineered Mouse Models

Mouse models were generated or provided by different collaboration partners (M.S., M.T., T.S., S.S., B.U.S., J.R., R.R., D.S.) and experiments were approved by the local animal welfare committees (Regierung von Oberbayern, Munich, Germany, ROB-55.2-2532.Vet_02-17-79 (D.S., M.T.); Regierung von Oberbayern, Munich, Germany, ROB-55.2-2532.Vet_02-15-26, ROB-55.2-2532.Vet_02-14-86 and ROB-55.2-2532.Vet_02-20-9 (B.U.S., J.R., T.S.); Regierungspräsidium Karlsruhe and Landesdirektion Sachsen, Germany, AZ G-188/11 (S.S.); UK Home Office (M.S., R.R.)). Proper genotyping of each mouse and model was assured by the collaboration partners. For details on the employed mouse models (genotypes pseudonymized), affected pathways, and mouse groups, please refer to Table S1. Intestinal tumors in WT were chemically induced via administration of Azoxymethane (AOM)/Dextran Sodium Sulfate (DSS) [40]. Active β -catenin mouse models (β CAT) were generated by deleting exon 3 of the β -catenin gene via an intestinal Cre-loxP system [38]. *Apc*^{fl/wt} [37], *Kras*^{G12D} [36], and *Braf*^{V637E} [33] mice were crossed with an intestinal epithelial cell-specific Cre driver line [41]. For models with tumor induction via a surgical Adeno-Cre infection [34], animals with an APC; KRAS background were crossed in different combinations harboring genetic alterations in various genes commonly altered in sporadic CRC (“complex” models) [35]. Mouse models with a germline ablation of Interferon-gamma (IFN γ) [42] and GEMMs with a deficiency in the CARD/BCL10/MALT1 (CBM) signaling

pathway—in either an immune cell (IC) subset, intestinal epithelial (IE) cells, or full-body KO—were also amongst the investigated GEMMs (Table S1).

2.2. Human Patients

The human cohort used in this study consisted of 17 low-grade (LG) adenomas, 12 high-grade (HG) adenomas, and 75 adenocarcinomas (Figure S1). Biopsies ($n = 30$) and whole tumor specimens ($n = 74$) of patients who underwent either colonoscopy or surgical resection between 2004 and 2019 at the University Hospital Klinikum rechts der Isar Munich (MRI) of the Technical University of Munich, Germany were analyzed retrospectively. For 81 intestinal lesions, adjacent non-neoplastic intestinal mucosa was available on the same slide. Data was extracted from the Munich Cancer Registry as well as from hospital records. The use of human tissue was approved by the local ethics committee of the Technical University of Munich/Klinikum rechts der Isar (reference number: 506/17s).

2.3. Histology, Immunohistochemistry, and Slide Digitalization

Serial tissue sections of 2 μ m thickness were cut from human and murine FFPE blocks using a rotating microtome (RM2245 Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Hematoxylin and eosin (H.E.) stainings were performed according to a standard protocol. Due to effective heparin absence, intestinal MMCs are sensitive to formalin fixation and thus cannot be detected by metachromatic staining methods, such as standard toluidine blue (T.B.) staining [14,15]. In order to confirm this, T.B. staining at pH 2.3 (Toluidine blue O, 1B-481.00010, Waldeck, Münster, Germany) was also performed (Figure S2).

For the identification of intestinal MMCs, IHC was applied. For each cohort, serial FFPE sections were cut gradually, and empty cuts were stored properly and as short as possible. Sectioning and immunohistochemical experiments were performed stepwise but in a timely manner between 01/2020 and 11/2021 on IHC autostainers (murine tissue on Leica Bond RX^m, Leica, Wetzlar, Germany and human tissue on a Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, US). Briefly, mouse serial sections were examined immunohistochemically by using primary antibodies for murine mast cell protease 1 (MCPT1) (mMCP-1, [RF6.1], a β -chymase [43]), mast cell tryptase (MCPT6) (TPSAB1; homologous to mMCP-6 [44]), granzyme B, and histamine. On human tissue, MC-Tryptase (MCT) [AA1], MC-Chymase (MCC) [CC1], CD117, and histamine antibodies were applied. Additionally, an anti-Ki-67 antibody was applied in order to visualize tumor cell proliferation. For each antibody, adequate positive and negative (tissue and reagent) controls were included. If true invasion of neoplastic cells was inconclusive on an H.E. slide, further sectioning, PAS reaction, and/or Pan-cytokeratin IHC were performed in order to obtain a secure diagnosis regarding tumor grade.

In order to gain first insights into the functional role of ieMMCs in intestinal neoplasia, we also performed Interleukin-5 (IL-5) ($n = 28$) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) ($n = 19$) on selected slides. Immunohistochemical double staining as a proof of principle, i.e., visualization of interepithelial located mast cells above the basal membrane, was also applied. A combination of collagen IV (for visualization of the basal lamina) and MCC or MCT (for visualization of MCs) was used. Antibody binding was visualized with a brown chromogen (3,3'-diaminobenzidine (DAB), Bond Polymer Refine Detection, DS9800, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) and a red chromogen (alkaline phosphatase, Bond Polymer Refine Red Detection, DS9390, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

For details on the panel of primary antibodies used in this study, the corresponding working dilutions, and IHC protocols, see Supplementary Tables S2 (mouse) and S3 (human).

After laboratory processing, slides were scanned in 40 \times magnification using a whole-slide brightfield scanner (Aperio AT2, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

2.4. Histological Grading of Intestinal Neoplastic Lesions

A trainee pathologist (T.G.) and a board-certified veterinary pathologist (K.S.) independently evaluated H.E. slides. Intestinal lesions were classified according to the current state-of-the-art toxicopathological criteria for gastrointestinal lesions [30,45]. For a short overview of the applied intestinal lesion classification and grading scheme, see Supplementary Table S4. Murine lesions were graded as: atypical hyperplasia; low-grade adenoma; high-grade adenoma; or adenocarcinoma with an invasive component (Figure S3). Lesions were included only if connection to the tunica muscularis of the intestinal wall was retained. In total, 274 murine intestinal neoplastic lesions were annotated in tissue sections originating from 100 different mouse organisms of 12 different genotype groups (Table S1). The different GEMMs were grouped according to (1.) their genotype; (2.) mode of tumor induction (genetic-, chemical-, or viral-based).

Human intestinal lesions were subtyped, graded, and staged by board-certified human surgical pathologists (C.M., M.J., W.W.) according to the current WHO classification of tumors of the colon [46].

2.5. Descriptive Semiquantitative Score of Mast Cell Infiltration

Semiquantitative scoring allows for robust group comparisons and inter- and intra-observer reproducibility of descriptive tissue data [47]. Therefore, a semiquantitative tissue score was established for determining occurrence of ieMMCs and IpMMCs in intestinal neoplastic lesions of mice and humans. An ordinal 5-tier-score (0 to 5 representing no (0) to high (5) ieMMC density) with species-specific cut-off values was set (Tables 1 and 2; Figure S4). Validation and reproducibility of the applied morphologic scoring system were achieved by scoring selected slides through a second observer, who was a board-certified veterinary pathologist (inter-observer; K.S.), as well as by randomly scoring slides repeatedly by the first observer (intra-observer; T.G.). Pathologists were blinded to mouse model groups. Digitalized slides were scored by using the counter tool of the Aperio ImageScope x64 software (v.12.4.0.7018, Leica Biosystems Pathology Imaging, Wetzlar, Germany) on a standard monitor (Wacom Cintiq 22HD, Kazo, Saitama, Japan).

Table 1. Semiquantitative evaluation of murine interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs).

Score	Description
0	No positive ieMMCs in the evaluated area
1	Positive staining of single ieMMCs (≤ 5 /hpf ¹) per hotspot ²
2	Positive staining of few diffuse ieMMCs (≤ 10 /hpf) per hotspot
3	Positive staining of some diffuse ieMMCs (≤ 20 /hpf) per hotspot
4	Positive staining of many diffusely distributed or possibly clustered ieMMCs (≤ 30 /hpf) per hotspot
5	Positive staining of many ieMMCs (> 30 /hpf) and dense clustering per hotspot

¹ high-power field (hpf; 40 \times field; Aperio ImageScope x64 v.12.4.0.7018); ² one hotspot (= hpf with the highest MC density per tumor) was counted and scored; the number of positive ieMMCs was considered in two hotspots (one hotspot of tumor-adjacent normal tissue and one hotspot of the neoplastic area).

Table 2. Semiquantitative evaluation of human ieMMCs.

Score	Description
0	No positive ieMMCs in ten \times 20 fields ¹
1	Single positive (≤ 5) ieMMCs in ten \times 20 fields
2	Few positive (≤ 10) ieMMCs in ten \times 20 fields
3	Moderate number of positive (≤ 20) ieMMCs in ten \times 20 fields
4	Many (≤ 30) ieMMCs in ten \times 20 fields
5	Dense (> 30) ieMMCs in ten \times 20 fields

¹ Ten \times 20 fields (Aperio ImageScope x64 v.12.4.0.7018) were randomly selected throughout the neoplastic and normal mucosal area and separately scored.

2.5.1. Semiquantitative Score for Murine Tissue

In mice, IHC positive (+) ieMMCs, in terms of a brown DAB-precipitate for MC markers (MCPT1, granzyme B, MCPT6) and a morphologically addressable interepithelial location (Figure 1), were separately counted in MC hotspots (40× high-power field, hpf) of intra-tumoral and of tumor-adjacent normal tissue on the same slide. Slides were first screened under low power in order to identify areas with the highest MC density (MCD). High-power fields with the highest density of ieMMCs were defined as hotspots (Figure 2). MC counts in these hotspots were scored from 0 (no mast cells) to 5 (positive staining in >30 densely clustered mast cells/hotspot) (Table 1, Figure S4). If available on the slide, normal mucosa adjacent to the neoplastic lesion was also scored ($n = 268$).

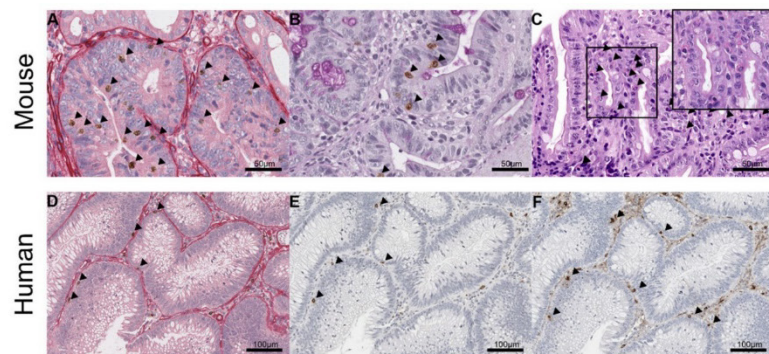


Figure 1. Identification of interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs; arrowheads) in murine (A–C) and human (D–F) intestine. (A) Immunohistochemical sequential double staining of basal lamina (collagen IV) and ieMMCs (MCPT1) clearly reveals interepithelial localization of murine ieMMCs; (B) PAS reaction and ieMMC IHC (MCPT1) confirms interepithelial location of MCPT1⁺ cells; (C) Prominent accumulation of small, round cells containing large, brightly eosinophilic granules located in intestinal hyperplastic epithelium of a hematoxylin-eosin (H.E.) section; (D) Immunohistochemical sequential double staining of basal lamina (collagen IV) and ieMMCs (MC-Chymase; MCC) clearly reveals interepithelial localization of human ieMMCs; (E) Serial sections of MCC and; (F) MC-Tryptase (MCT) immunohistochemistry (IHC) in a human intestinal adenoma.

Notably, ieMMC scores clearly differed between the apical and basal tumor area (lower third of the tumor next to the submucosa) or tumor center (if lesions were cut transversally), respectively. Thus, in a first step separate scores of apical tumor regions (luminal) vs. tumor basis/center (submucosal site) were applied (Figure 3). Finally, the apical MCPT1⁺ score (accounting for the highest MCD of the whole tumor) was considered to be representative.

Granzyme B⁺ and MCPT6⁺ ieMMC scores were determined for hotspots without differentiating between zones. The same score as described above was applied for granzyme B and MCPT6 (Table 1, Figure S4). Additionally, lpMMCs (MCPT6⁺) were counted and scored as described for ieMMCs (Table S5A).

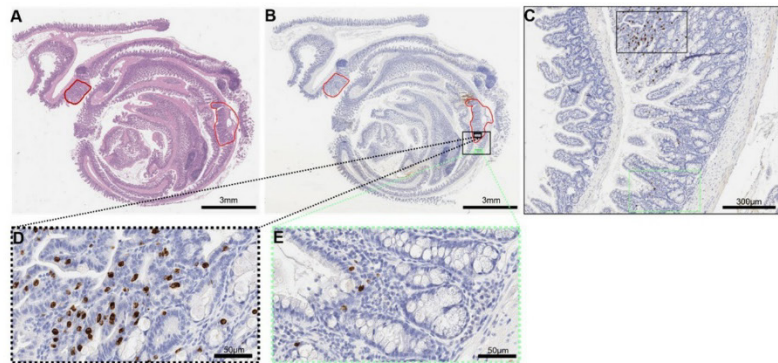


Figure 2. Analysis of ieMMCs in murine colon rolls. (A) Intestinal lesions were graded and annotated (red line) in an H.E. section; (B) Accordingly, a serial section of MCPT1 IHC was annotated; (C) Hotspots of MCPT1⁺ mast cells (MCs) were identified in neoplastic mucosa (black frame) and normal mucosa (green frame); (D) Mast cell numbers were counted in one 40× field (high-power field, hpf) of the respective hotspot. A semiquantitative score was applied (Figure S4) (Table 1); (E) In the adjacent normal mucosa, MC numbers were counted and scored accordingly.

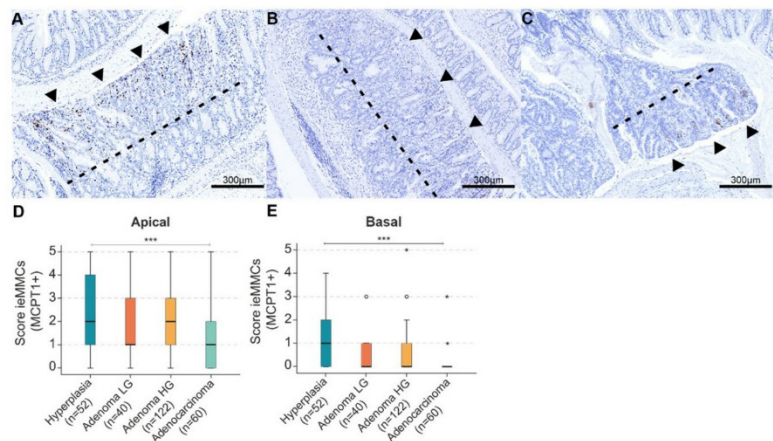


Figure 3. (A–C) In murine intestinal neoplasia ($n = 274$), MCPT1⁺ ieMMC were generally more abundant in the apical two thirds of the lesion (luminal site; arrowheads) compared to the basal, lower third of tumor tissue (submucosal site). The dotted line divides the different zones; (D–E) Generally, ieMMC scores were higher in the apical (D) than in the basal (E) areas of intestinal neoplastic lesions; (D) Kruskal–Wallis test (KWT) of ieMMC scores in the apical aspects of tumors during adenoma-carcinoma progression. Scores for ieMMC were higher in precursors (atypical hyperplasia and low- and high-grade adenomas) than in carcinomatous lesions (KWT *** $p < 0.001$); (E) KWT of ieMMC scores in the basal aspects of tumors during adenoma-carcinoma progression (KWT *** $p < 0.001$). * = extreme statistical outliers; ° = mild statistical outliers.

2.5.2. Semiquantitative Score for Human Tissue

In human lesions, in sharp contrast to murine lesions, hotspots of clustered ieMMCs were not present. In order to gain an overview of the entire human neoplastic tissue specimen, positive ieMMCs (MCC⁺, MCT⁺, CD117⁺), as defined above (Figure 1), were

counted in 10 randomly selected 20× fields of neoplastic and also in matched adjacent normal colonic mucosa (if available on the same slide). Total ieMMC counts were scored from 0 (no positive cells) to 5 (dense (>30) MCs in ten 20× fields) according to Table 2. In human specimens, IpMMCs and CTMCs were pooled as intratumoral stromal mast cells (ITSMCs), since a clear delineation according to cell size, shape, and location was not possible [48].

Intratumoral stromal mast cells (ITSMCs) located between neoplastic crypts (MCC⁺, MCT⁺) were scored from 0 (no MCs in ten 20× fields) to 5 (>200 IpMMCs in ten 20× fields) (Table S5B). In human specimens, congruent areas were evaluated for all applied MC IHC markers and scores.

2.6. Computer Assisted Analysis of Tumor Cell Proliferation (Ki-67)

Ki-67 index of whole murine tumors was assessed by means of a computer-assisted algorithm using QuPath version 0.3.0 for quantification [49]. Areas were annotated by using a pencil and touch monitor (Wacom Cintiq 22HD, Kazo, Saitama, Japan). The default set of parameters of the algorithm was modified according to the stain contrast and intensity of the scanned images. Cell segmentation was performed using the settings specified in Table S6. Cell classification (tumor cells or stromal cells) was done after training an object classifier using ‘Random trees’ as a machine learning method [50]. Proliferation in terms of nuclear positive Ki-67 staining was calculated within the class “tumor cells” (% Ki-67⁺ cells/tumor cells).

2.7. Statistical Analyses

Statistics were performed using the SPSS Statistics v. 27 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive statistical tests (mean, standard deviation (SD), median, interquartile range (IQR)) were calculated according to standard methods.

Following the collection of semiquantitative ordinal scoring data as described above, non-parametric statistical analyses for various independent group comparisons (atypical hyperplasia; low-grade adenoma; high-grade adenoma; adenocarcinoma) were performed (one-way ANOVA Kruskal–Wallis test (KWT) with post-hoc Bonferroni multiple comparison test).

For comparison of non-normally distributed ieMMC scores within neoplastic and normal colonic compartments, a Mann-Whitney U (MWU) test was applied for statistical analysis. For all analyses, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Comparative Histopathological Description and Characterization of Intestinal Mucosal Mast Cells

Overall, MCs were located above the epithelial basal membrane, between intestinal epithelial cells (ieMMCs), in murine as well as in human neoplastic intestinal mucosa (Figure 1). The morphological definition of ieMMCs was based on the study of Vogel et al., 2018 [17]. The interepithelial aspect of ieMMCs was clearly present in humans and mice (Figure 1), while immunohistochemical (granular) characteristics differed to some extent (Table 3).

In our comparative experimental pathology laboratory [51], a considerable number of intestinal lesions generated in GEMMs has been evaluated histologically. An intriguingly prominent accumulation of small round cells containing large brightly eosinophilic granules similar to MC granules—located in intestinal hyperplastic, adenomatous, or carcinomatous lesions—was evident in H.E. specimens. In the murine intestine, MCPT1 is a specific marker for ieMMCs according to Vogel et al., 2018 [17], which was also the case in our study. Additionally, murine ieMMCs were also positive for tryptase (MCPT6) ($n = 248$) and granzyme B ($n = 271$), but were negative for histamine ($n = 37$) (Figure S5).

Table 3. Reactivity for MC subtypes for each of the primary antibodies.

Marker	ieMMC ¹ (Mouse)	IpMMC ² (Mouse)	ieMMC (Human)	ITSMC ³ (Human)
MCPT1 (mMCP-1) ⁴	+	-	-	-
Anti-human MC-Chymase	n/a ⁶	n/a	+	+
Anti-human MC-Tryptase	n/a	n/a	+	+
TPSAB1 (mMCP-6) ⁵	+	+	+	+
Histamine	-	-	-	+
Granzyme B	+	+	n/a	n/a
CD117 (c-kit)	n/a	n/a	+	+

A “+” sign indicates that the respective mast cell subtype expresses the marker and a “-” sign indicates that the subtype does not express the marker. ¹ Interepithelial mucosal mast cell (ieMMC); ² lamina propria mucosal mast cell (IpMMC); ³ intratumoral stromal mast cell (ITSMC); ⁴ mast cell protease 1 (MCPT1); murine mast cell protease 1 (mMCP-1); ⁵ tryptase alpha-1 and beta-1 (TPSAB1); murine mast cell protease 6 (mMCP-6); ⁶ not available (n/a) as markers were not assessed in or not appropriate for the respective species (n/a).

In human tissue, MCT, MCC and CD117 were found to be appropriate markers for ieMMCs. In general, human ieMMCs showed positivity for MCT more frequently than for MCC (MCTC included) and for CD117 (Table 4A). Human ieMMCs were consistently negative for histamine ($n = 51$) (Figure S5).

Table 4. (A) Interepithelial mucosal mast cell (ieMMC) counts (mean) in ten × 20 fields and scores (median) of human intratumoral intestinal mucosa (MCT, MCC, CD117). (B) Interepithelial mucosal mast cell (ieMMC) scores (median) of murine intratumoral and adjacent intestinal mucosa.

(A)				
Lesion	<i>n</i>	ieMMC Tumor Count (mean ± SD) ¹ MCT ²	ieMMC Score (median ± IQR) ³ MCT ²	
Low-grade adenoma	17	14.35 ± 11.784	3 ± 2	
High-grade adenoma	12	4.17 ± 3.040	1 ± 1	
Adenocarcinoma	75	0.47 ± 1.605	0 ± 0	
<i>p</i> (KWT) ⁴	104	< 0.0001		
Lesion	<i>n</i>	ieMMC tumor count (mean ± SD) MCC ⁴	ieMMC score (median ± IQR) MCC ⁴	
Low-grade adenoma	17	4 ± 4.287	1 ± 1	
High-grade adenoma	12	1.25 ± 2.137	0 ± 1	
Adenocarcinoma	75	0.16 ± 0.698	0 ± 0	
<i>p</i> (KWT)	104	< 0.0001		
Lesion	<i>n</i>	ieMMC tumor count (mean ± SD) CD117	ieMMC score (median ± IQR) CD117	
Low-grade adenoma	17	3.29 ± 9.841	0 ± 1	
High-grade adenoma	12	0.67 ± 1.371	0 ± 1	
Adenocarcinoma	22	0.05 ± 0.213	0 ± 0	
<i>p</i> (KWT)	51	0.019		

Table 4. Cont.

(B)				
Lesion	<i>n</i>	ieMMC score ⁵ (median ± IQR) MCPT1 ⁶	<i>n</i>	ieMMC score (median ± IQR) MCPT6 ⁷
Hyperplasia	52	2 ± 3	42	1 ± 2
Low-grade adenoma	40	1 ± 2	34	1 ± 2
High-grade adenoma	122	2 ± 2.25	115	1 ± 2
Adenocarcinoma	60	1 ± 2	57	0 ± 1
<i>p</i> (KWT)	274	< 0.001	248	< 0.001
Lesion	<i>n</i>	ieMMC score (median ± IQR) granzyme B	<i>n</i>	ieMMC score (median ± IQR) MCPT1 (adjacent mucosa)
Hyperplasia	52	2 ± 3	49	0 ± 0
Low-grade adenoma	40	2 ± 2.75	40	0 ± 0
High-grade adenoma	121	2 ± 3	121	0 ± 1
Adenocarcinoma	58	1 ± 2	58	0 ± 1
<i>p</i> (KWT)	271	< 0.001	268	0.69

¹ Standard deviation (SD); ² mast cell tryptase (MCT); ³ interquartile range (IQR); ⁴ Kruskal–Wallis test (KWT), *p* < 0.05 statistically significant. ⁴ mast cell chymase (MCC). ⁵ In mice, the hotspot with the highest ieMMC score throughout the whole tumor was considered to be representative; ieMMCs positive for ⁶ mast cell protease 1 (MCPT1); ⁷ mast cell protease 6 (MCPT6).

Tryptase-positive murine IpMMCs were clearly identified and were located in the intestinal lamina propria with an appearance that was slender and smaller than that of CTMCs (Figure S6). In human intestinal neoplasia, considering their larger size, more invasive nature, and complex tissue architecture, a clear distinction between IpMMCs and CTMCs in terms of cell size and shape could not be achieved. Due to this fact, in the human setting, both IpMMCs and CTMCs were grouped into intra-tumoral stromal mast cells (ITSMCs), defined as MCs located in the stroma between neoplastic crypts (Figure S7). Individual human CTMCs appeared to be unspecifically positive due to the presence of heparin within the MCs, causing ionic interactions with antibodies [52], while human ieMMCs were negative in negative reagent controls (Figure S8).

3.2. Human

3.2.1. Interepithelial and Stromal Mast Cell Scores in Human Precursor Lesions, Adenocarcinomas, and Adjacent Normal Intestinal Mucosa

In human intestinal lesions (*n* = 104), intratumor ieMMC scores (MCT⁺, MCC⁺) decreased from precursor lesions (low-grade (LG) and high-grade (HG) adenoma) to adenocarcinoma (*p* < 0.0001, KWT) (Figure 4). Expression of CD117 (*n* = 51) revealed the same trend (*p* = 0.019, KWT) (Table 4A). Additionally, the presence of ieMMCs (MCT⁺, MCC⁺) was assessed in adjacent normal mucosa (*n* = 81) of LG and HG adenoma and adenocarcinoma. Scores for ieMMCs in adjacent mucosa were lowest for cases with HG adenoma, intermediate for patients with adenocarcinoma, and highest adjacent to LG adenoma (*p* = 0.047 (MCT) (Figure 5) and *p* = 0.018 (MCC), KWT) (Table S8).

Human ITSMCs (MCT⁺ and MCC⁺), which were generally more abundant than ieMMCs, decreased from precursor lesions to adenocarcinoma (*p* < 0.001, KWT) (Figure S7). The same trend was evident for CD117⁺ ITSMCs (*p* < 0.001, KWT), whereas for histamine-positive ITSMCs, stromal MCD was generally reduced and lowest for LG adenomas, intermediate for adenocarcinomas, and highest for HG adenomas (*p* = 0.167, KWT) (Table S8).

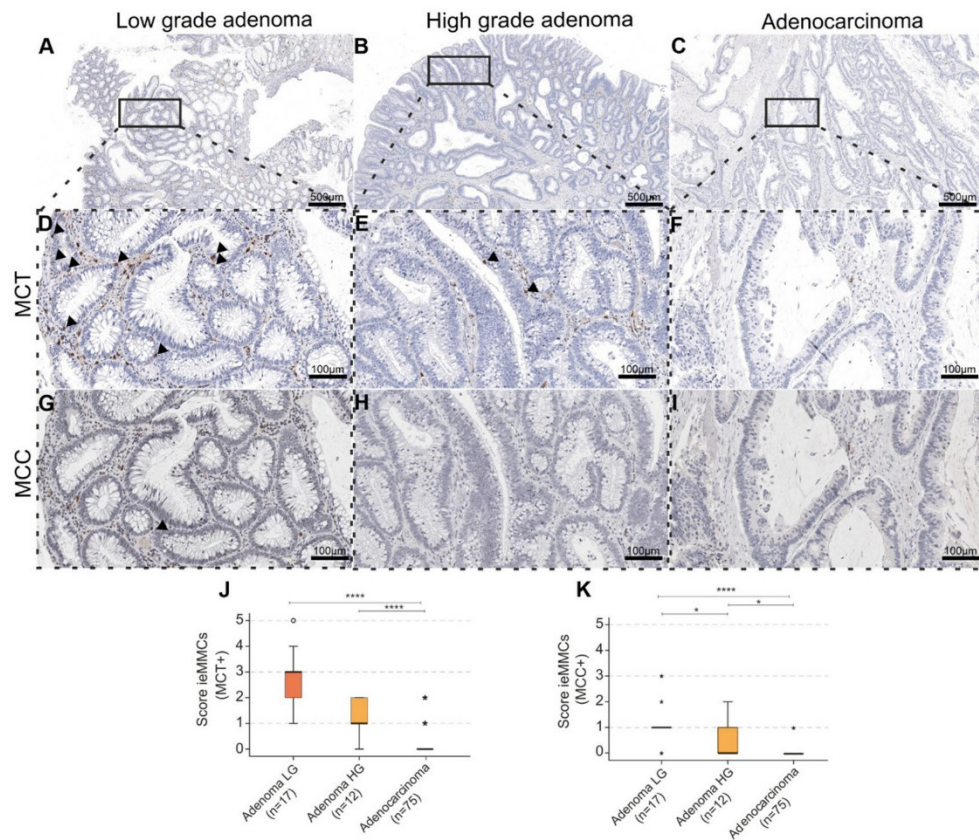


Figure 4. (A–I) In the context of human adenoma-carcinoma progression (A–C), ieMMCs (arrowheads) positive for MCT (D–F) and MCC (G–I) decreased from low-grade (LG) to high-grade (HG) adenoma and adenocarcinoma (ACA) (serial sections); (J,K) Generally, median scores for ieMMCs in adenomas were higher for MCT (KWT, pairwise comparison of ACA-LG **** $p < 0.0001$; ACA-HG **** $p < 0.0001$) (J); than for MCC (KWT, pairwise comparison of LG-HG * $p = 0.022$; HG-ACA * $p = 0.017$; LG-ACA **** $p < 0.0001$) (K). * = extreme statistical outliers; ° = mild statistical outliers.

3.2.2. General Comparison of ieMMC Scores in Normal Mucosa vs. (Pre-)Neoplastic Human Tissue

Generally, human ieMMC scores (MCT⁺, MCC⁺) were lower in neoplastic tissue compared to normal mucosa ($p < 0.001$, MWU test) (Figure 5) (Table S8). In the adjacent mucosa, MCT⁺ ieMMCs were more frequently detected than MCC⁺ ieMMCs, which was in accordance with the protease content of ieMMCs located in neoplastic tissue. Thus, no phenotypic alteration with regard to mast cell proteases between normal and neoplastic intestinal mucosa was observed.

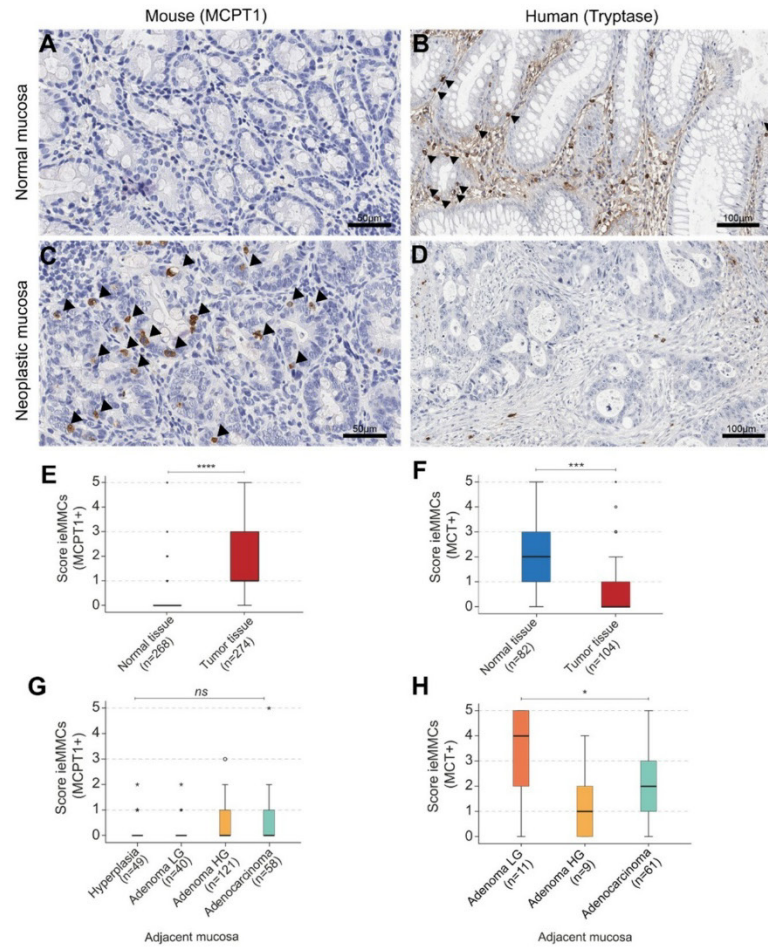


Figure 5. (A–D) Interepithelial mucosal mast cell (ieMMC) (arrowheads) in normal vs. neoplastic colonic mucosa of murine (A,C) and human (B,D) intestine; (E) Generally, scores of ieMMCs were higher in (pre-)neoplastic lesions of mice (Mann-Whitney U test (MWU), **** $p = 0.000$); (F) Contradictory, human ieMMC scores were higher in normal adjacent tissue (MWU, *** $p < 0.001$); (G) IeMMCs in the adjacent normal mucosa of mice increased in the course of adenoma-carcinoma progression (KWT, $p = 0.690$, not significant (ns)); (H) In humans, density of ieMMCs in adjacent normal mucosa decreased from LG adenoma to carcinoma to HG adenoma (KWT, * $p = 0.047$). * = extreme statistical outliers; ° = mild statistical outliers.

3.3. Mouse

3.3.1. Interepithelial and Lamina Propria Mucosal Mast Cell Scores in Murine Precursor Lesions, Adenocarcinomas, and Adjacent Intestinal Mucosa

Histological scores for MCPT1⁺, MCPT6⁺ and granzyme B⁺ ieMMCs showed that ieMMC density decreased from precursor lesions (atypical hyperplasia; LG; HG adenoma) to adenocarcinoma ($p < 0.001$) (Table 4) (Figure 6B–D). In contrast to this finding, ieMMC

density in adjacent normal mucosa increased from precursor to carcinomatous lesions ($p = 0.690$) (Figure 5G).

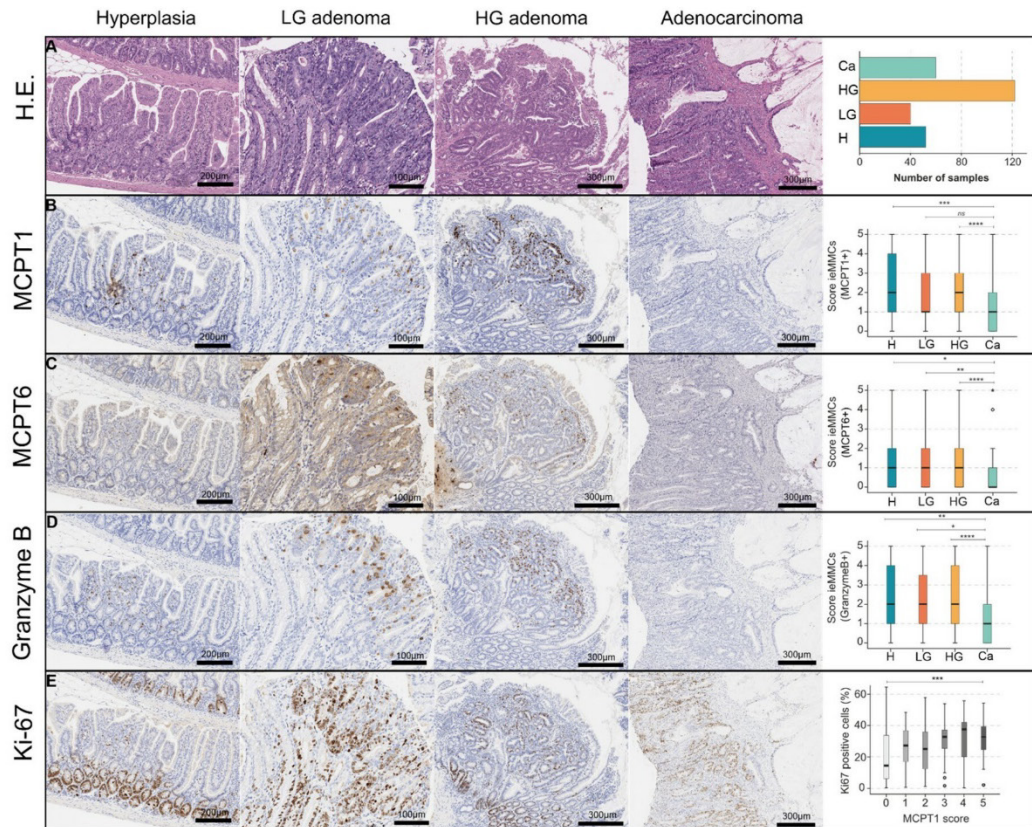


Figure 6. (A–D) In the context of murine adenoma-carcinoma progression (A) ieMMC scores generally decreased from low-grade adenoma to carcinoma (KWT, pairwise comparisons, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; not significant (ns) $p > 0.05$). IeMMCs were identifiable using MCPT1 (B), MCPT6 (C), and granzyme B (D) IHC; (E) Higher ieMMC scores were connected to a higher proliferation in terms of % Ki-67⁺ tumor cells in a neoplastic lesion ($n = 271$) (KWT, *** $p < 0.001$). * = extreme statistical outliers; ° = mild statistical outliers.

In mice, ieMMCs were most prominent in the apical region of the neoplasia. Separate scores of apical tumor regions (luminal) vs. tumor basal/central regions (submucosal site) showed that scores were generally higher in the apical tumor (Figure 3).

LpMMCs were visualized by evaluating MCPT6⁺ cells located in the lamina propria ($n = 248$). Compared to the decreasing number of ieMMCs from precursor to carcinomatous lesions, lpMMC scores increased from precursors to carcinoma ($p = 0.001$) (Figure S7).

3.3.2. General Comparison of ieMMC Scores in Normal Mucosa vs. (Pre-)Neoplastic Murine Tissue

Across all lesion groups, scores for ieMMCs were lower in the adjacent normal mucosa ($n = 268$) than in neoplastic tissue. Generally, numbers of MCPT1⁺ ieMMCs decreased from

the apical to the basal/central tumor areas (Figure 3) and the normal mucosa (Figure 5). A MWU test revealed a significant difference between higher (pre-)neoplastic and lower normal adjacent mucosal ieMMC scores in murine intestinal lesions ($p = 0.000$) (Figure 5).

3.3.3. Comparison of ieMMC Scores in Different Intestinal Carcinogenesis GEMMs and Intestinal Localizations

Scores for ieMMCs in the tumor area differed between the investigated GEMMs ($p < 0.0001$, KWT) (Figure 7A). For details on the GEMMs (pseudonymized) please refer to Supplementary Table S1. Considering all lesions regardless of grade and intestinal location, ieMMC scores assessed in lesions of BRAF mice ($n = 20$; median score 0.5) were generally low in comparison to other models (BRAF vs. β CAT $p < 0.0001$ (β CAT median score 3.5); BRAF vs. IE-CBM-deficient $p < 0.001$ (IE-CBM median score 3); BRAF vs. β CAT+IE-CBM-deficient $p = 0.034$ (β CAT+IE-CBM median score 2); BRAF vs. APC $p = 0.075$ (APC median score 2)) (Figure 7A). Additionally, in KRAS mice, ieMMC density was low (median score 1.5). However, increasing this specific cohort would be important to confirm this result (Figure 7A).

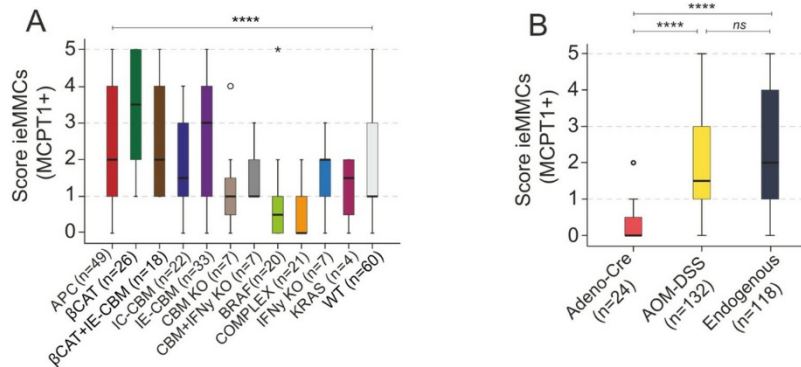


Figure 7. (A,B) Scores for ieMMCs over all tumor grades were compared according to genotype groups (KWT, **** $p < 0.0001$). For details on the pseudonymized genetically engineered mouse groups, please refer to Supplementary Table S1 (A); additionally, group comparison according to mode of tumor induction was performed (KWT, $p < 0.0001$) (B). (A) Scores assessed in lesions of *Braf*^{V637E} mice (BRAF) ($n = 20$; median score 0.5) were generally low, while scores were highest in lesions of the *Catnb* ^{Δ ex3} model (β CAT) ($n = 26$; median score 3.5); (B) Scores in Adeno-Cre-induced tumors were lower than in AOM-DSS-induced (KWT, pairwise comparison **** $p < 0.0001$) and in endogenous models' scores (KWT, pairwise comparison **** $p < 0.0001$) and in endogenous models' scores (KWT, pairwise comparison **** $p < 0.0001$). There was no statistically significant effect between AOM-DSS and endogenous models ($p = 0.636$; not significant (ns)). * = extreme statistical outliers; ° = mild statistical outliers.

Scores for ieMMCs were generally high in lesions of the β CAT model ($n = 26$; median score 3.5) (β CAT vs. BRAF $p < 0.0001$; β CAT vs. complex models $p < 0.0001$ (complex median score 0); β CAT vs. WT $p = 0.007$ (WT median score 1); β CAT vs. APC $p = 0.138$) (Figure 7A).

We found no strong difference between the ieMMC scores of AOM-DSS-treated WT mice ($n = 60$; median score 1) and genetically modified mice ($p = 0.563$, MWU; data not shown). When lesions were separately analyzed by tumor grade, there was generally no clear evidence for a decrease in the occurrence of ieMMCs in the course of adenoma-carcinoma progression of each individual GEMM (data not shown) as it was observed in spontaneous human lesions (Figure 4). In virally induced GEMMs, where tumors were surgically induced by Adenovirus-Cre [34], ieMMC tumor infiltration was lower (median

score = 0) than in AOM-DSS-induced (median score = 1.5) and endogenous (median score = 2) models ($p < 0.001$, KWT) (Figure 7B).

Most strikingly, murine ieMMC scores were generally higher in small intestinal lesions than in colonic neoplasia ($p < 0.001$, MWU) (Figure 8A). Decreasing ieMMC scores were found in the atypical hyperplasia–adenoma–carcinoma progression of murine colonic lesions ($p < 0.001$) (Figure 8B). In contrast, strong group differences between ieMMC scores in small intestinal lesions of different tumor grades were not evident ($p = 0.222$) (Figure 8C).

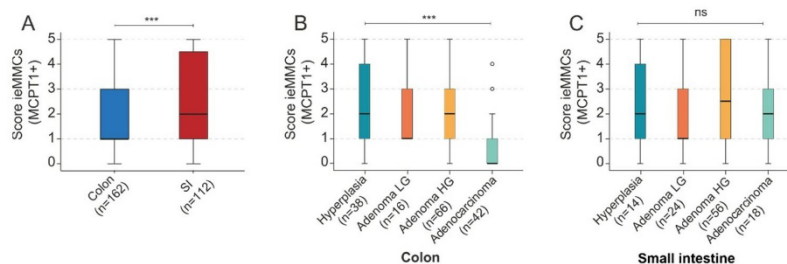


Figure 8. (A) Scores for ieMMCs were generally lower in murine colonic tumors ($n = 162$) than in murine small intestinal tumors ($n = 112$) (KWT, *** $p < 0.001$); (B) Scores for ieMMCs decreased from atypical hyperplasia to carcinoma in the colon (KWT, *** $p < 0.001$); (C) However, in the small intestine scores for ieMMCs did not decrease from precursors to invasive neoplasia (KWT, $p = 0.222$, not significant (ns)). ° = mild statistical outliers.

3.3.4. Tumor Proliferation and First Functional Investigations of Murine Intestinal ieMMCs

In order to elucidate the correlation between tumor cell proliferation with the presence of MCs, we also assessed proliferation (Ki-67) of whole tumor areas and found that lower ieMMC scores were associated with a lower Ki-67 proliferative activity ($p < 0.001$, KWT). Tumor proliferation, as assessed by a high percentage of Ki-67⁺ tumor cells, was associated with an increased occurrence of ieMMCs (Figure 6E).

Aiming at elucidating the mechanistic effects of ieMMCs we also investigated the immunohistological presence of MMP-9 and IL-5 in the cohorts. Finally, a histomorphological correlation between the presence of ieMMCs in areas of intestinal neoplasia and MMP-9 or IL-5 immunoreactivity was not possible to infer. MMP-9⁺ cells did not colocalize with ieMMCs (Figure S9A–F). Luminal intestinal crypt cells were often positive for IL-5, but IL-5 positivity did not correlate with ieMMC density (Figure S9G–L).

3.4. Comparison of ieMMCs in the Adenoma–Carcinoma Sequence of Mice and Humans

IeMMCs were a common finding in intestinal neoplastic epithelium of mice (hotspots) and humans. Overall, the number of ieMMC decreased from LG to HG adenomas and to adenocarcinomas in both species. Importantly, ieMMC scores in human and murine colonic carcinomas were generally lower than in adenomas, suggesting that ieMMCs are immune pioneers in the colonic TME that enhance tumor progression and subsequently retreat in carcinomas. This trend was most evident in colonic lesions of different GEMMs (Figure 8B) and in human CRC (Figure 4), whereas in murine small intestinal lesions, ieMMC scores did not differ between carcinomas and LG adenomas (Figure 8C).

In contrast to mice, ITSMCs in human intestinal neoplastic lesions were generally more abundant and scores were highest in HG adenomas (Figure S7).

A difference between mice and humans was the decreased ieMMC score in murine normal tissue adjacent to neoplastic epithelium, whereas in humans, ieMMC density in adjacent normal tissue increased in comparison to neoplastic epithelium (Figure 5).

4. Discussion

The pathogenetic and clinically relevant role of MCs in inflammatory and allergic diseases as well as in mastocytosis is well-known and elucidated [53–55]. In humans, MCs are typed with respect to their granule content: tryptase (MC_T); chymase (MC_C); and tryptase- and chymase- (MC_{TC}) positive MCs [56,57]. In mice, MCs are categorized based on their topographic location: connective tissue MCs (CTMCs); mucosal MCs (MMCs) [16,48,58]. Vogel et al., 2018 specified the murine MC classification by introducing the terms interepithelial mucosal MCs (ieMMCs) and lamina propria mucosal MCs (lpMMCs) on one hand and connective tissue MCs (CTMCs) on the other hand [17]. These MC subtypes differ in their stored protease content and therefore in their biological effects [43]. In the murine intestine, ieMMCs express MCPT1 and MCPT2 (chymases), whereas lpMMCs and CTMCs express chymases and tryptases [17,59]. In the human intestinal mucosa, tryptase is the major enzyme of MMCs (MC_T or MC_{TC}) [57,60]. However, specific knowledge of the enzymatic properties of human intestinal ieMMCs is still lacking.

Since Ehrlich's (the "father of mast cells") times, it has been known that MC numbers increase in tumors [3,61,62] and it is speculated that they might have ambiguous functions in tumorigenesis in both mice and humans [2,62]. On one hand, MCs are found to promote tumor angiogenesis [63] and metastasis [24], suggesting a potential oncogenic role. On the other hand, MCs contribute to the improvement of host immunity against neoplastic cells [7,8,64], suggesting a tumor-suppressive effect. Mast cells of the TME interact with other immune cells [65] and neoplastic cells [10]. Recent research has focused on elucidating the interaction of primary tumor cells with MCs [9–11,66] and new therapeutic approaches have relied on the identification of MCs as possible biomarkers [6,67] and modulators of MC-dependent tumor promoting mechanisms [11,68–70].

In this observational study, we focused on the comparative characterization and description of ieMMCs in intestinal cancer of mice and humans in order to further elucidate the role of MC subsets in the TME. We investigated the occurrence of MMCs, especially of the newly defined ieMMC subtype [17], along the adenoma-carcinoma sequence of intestinal carcinogenesis. For that, we performed a retrospective evaluation of a large cohort of human samples and several mouse models with a strong focus on inter-species comparison between humans and regularly used GEMMs of biomedical CRC research. Our study delivers three main findings:

First, a prominent accumulation of ieMMCs in intestinal neoplastic lesions of mice and also humans was immunohistochemically identified. While in the former, ieMMCs were primarily arranged in hotspots, human ieMMCs were diffusely distributed within (pre-)neoplastic lesions. The motile MC is able to cross the basal lamina and to diffuse into the epithelium [20]. We immunohistologically verified MCPT1 (a β chymase [43]) as a specific ieMMC IHC marker in mice. In accordance with previous studies [59,71] we found that ieMMCs of murine intestinal lesions were, to a lower extent, $MCPT6^+$ (MCT^+), whereas no immunoreactivity of ieMMCs for MCT is described in intestinal helminth infection [17,72,73]. It is tempting to speculate that a switch in tryptase content might occur in tumor-infiltrating ieMMCs compared to ieMMCs which are related to helminth-induced immunopathology. Mast cell tryptase (MCT) is a well-known pro-angiogenic mediator [63,74] and it is strongly associated with protease-activated receptor 2 (PAR-2) expression on intestinal cells, thus contributing to tumor progression [9]. Accordingly, our data showed that an increased ieMMC score was generally associated with an increased level of tumor cell proliferation in murine intestinal tumors, being indicative of a proliferation-promoting impact of ieMMCs on intestinal cancer cells (Figure 6E).

In humans, few studies explicitly address ieMMCs as MCs located "within the epithelium", most often in airway diseases [75,76]. We show for the first time that, comparable to murine colonic carcinogenesis, ieMMCs frequently occur in the course of human colorectal carcinogenesis. In contrast to mice, MCT^+ ieMMCs were present even more frequently than MCC^+ ieMMCs (including MC_{TC}) (Figure 4). In accordance with our findings, Flores

de los Rios et al., 2020 showed that MCT⁺ MCs were more abundant and more frequently degranulated in human metastatic CRC [24].

The second finding was that colonic ieMMC scores generally decreased in the course of adenoma-carcinoma progression in both species, whereas small intestinal ieMMC scores did not. In our study, various small and large intestinal cancer GEMMs were analyzed. In the majority of previous studies, grading of mouse tumors is obscure and not according to standard pathological guidelines (e.g., “polyps”). We graded murine intestinal lesions according to the current toxicopathological state-of-the-art grading [30,45], which is in line with the human WHO classification [46], and investigated the occurrence of ieMMCs with respect to this comparative classification of the different stages of intestinal carcinogenesis.

Overall, scores of murine ieMMCs decreased from atypical hyperplasia to carcinoma (Table 4B, Figure 6B–D). The accumulation of MCs in murine adenomatous lesions has been previously described [7,59,77]. Gounaris et al., 2007 state that murine polyps are regularly infiltrated with MCPT2⁺ MCs and term them intraepithelial MCs [59]. These are morphologically and most likely also functionally equivalent to the herein described MCPT1⁺ ieMMCs. Moreover, the authors show that polyp-associated MCs are essential for the onset of intestinal adenomas [59]. In a following study, Saadalla et al., 2018 favor an MC-linked multistep carcinogenesis of murine small intestinal cancer that is rather dependent on MC subtype than on MC density, linked to the finding that MCPT6⁺ and MCPT5⁺ CTMCs expanded in invasive tumors [77]. In our hotspot-based evaluation, we found a numerically significant decrease of intratumoral ieMMCs during adenoma-carcinoma progression (Table 4B). However, further investigations of the biological relevance need to be conducted in the future. These should specifically focus on the contribution of the ieMMC subtype to intestinal carcinogenesis in variable molecular conditions, which are strongly dependent on the employed GEMM.

Interestingly, in colorectal lesions of mice, ieMMC density clearly decreased during the progressive sequence of carcinogenesis; however, ieMMC scores of small intestinal lesions were generally higher and did not decrease from low-grade adenoma to carcinoma (Figure 8). Our data are in agreement with the notion that murine small intestinal tumors have a different immunological milieu than colonic tumors and that MCs might therefore affect adenoma-carcinoma progression differently in the small intestine [77]. It is important to mention that a non-negligible proportion of GEMMs in CRC research (e.g., *Apc*-mutated) develop tumors predominantly in the small intestine [19,31], which is in sharp contrast to the human situation [78]. This indicates the importance of employing adequate mouse models, especially when it comes to the investigation of the immune microenvironment and possible immunotherapeutic strategies.

Our third major finding was that intratumoral ieMMC scores differed between variable GEMMs. Median score was low in WT, indicating an enhancement of ieMMC–tumor cell interaction related to specifically induced molecular carcinogenic changes. Scores were highest in β CAT, whilst they were lowest in the BRAF cohort and also low in the KRAS mouse model (Figure 7A). Via tryptase release, ieMMCs are able to activate PAR-2 on intestinal cells, which is connected to major G-protein-mediated signaling pathways, enhancing the Ras-Raf-MEK-ERK (MAPK) signal transduction cascade [9,11]. Since this cascade is already constitutively activated in *Braf*^{V637E}- and *Kras*^{G12D}-driven intestinal cancer models [33,36], the enhancement of MAPK signaling via MCs [11] might play a minor role in MAPK-driven intestinal cancer and ieMMC numbers remain low. It has previously been shown that Wnt/ β -catenin signaling promotes maturation of MCs and their pro-tumorigenic activity in intestinal cancer [71,79]. However, it still remains unclear which factors induced by strong Wnt/ β -catenin signaling in the intestinal tumor cell led to this immense MC migration, as it was seen predominantly in the β CAT and also APC model group (Figure 7A). Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) is one amongst several upregulated target genes of Wnt signaling [80,81] and it is known that VEGF acts as a chemoattractant for MCs [82]. Recent research focuses on the molecular interaction of human colon cancer and MCs [10,11,66]. However, the concrete underlying mechanisms,

enhanced by a close spatial relationship between the cancer cell and adjoining ieMMC, remain elusive. Further research is imperative in order to elucidate the possible biological pathways through which cancer cells drive MC migration, differentiation, and mechanisms and vice versa.

Finally, we hypothesize that the ieMMC subset is a particularly important component in the onset and progression of intestinal neoplasia in mice and in humans. Due to the spatial proximity of ieMMCs to the adjoining neoplastic epithelial cells, their influence on cancer cells is particularly interesting. We suggest that the functional role of ieMMCs in the TME differs from stromal MCs in murine and human CRC. Moreover, it will be tempting to investigate, if the prognostic significance of ieMMC and stromal mast cell density differs in humans and if ieMMC density itself could serve as an “ideal biomarker” for human CRC [67].

Advanced functional studies in MC-deficient mouse models [83–86] and second-generation GEMMs for intestinal cancer (e.g., tumor initiation plus Cre-mediated immune cell manipulation) will be required for ultimately determining the role of the MC subpopulations in intestinal cancer. For this reason, it is important to consider for instance that ablation of *Mcpt5* will not target ieMMCs. It will be vital to employ GEMMs, in which the efficient and specific targeting of all, or of one specific, MC subtypes is assured [85,86], considering the great relevance of MC heterogeneity in intestinal cancer. Furthermore, comparative studies focusing on potential differences in ieMMC and stromal MC occurrence between human samples and genetically similar specimens derived from murine models (e.g., *BRAF*-, *KRAS*-mutated tumors) combined with the prognostic assessment of MCs in human CRC should be conducted in the future. In addition, it is foreseeable that targeted therapies specific for MCs could be further explored in this context, thus offering another angle through which CRC could be treated [13].

5. Conclusions

We show that ieMMCs in murine and human intestinal lesions (FFPE) are reliably detectable using IHC markers such as MCC (MCPT1) and MCT (MCPT6). Interepithelial mucosal mast cells infiltrate the intestinal (pre-)neoplastic epithelium, and their numbers decrease along the adenoma-carcinoma progression of colonic tumors in mice and humans, whilst those of ieMMCs in murine small intestinal neoplasia as well as stromal MCs in both species do not. Therefore, we support a potentially different functional role of ieMMCs in comparison to stromal MCs during CRC progression. Given the obvious differences in the population dynamics of ieMMCs in (pre-)neoplasia of murine small and large intestine and also in different GEMMs for intestinal cancer, we strongly emphasize the need to employ adequate mouse models, especially when investigating the role of MCs within the immunologic milieu of CRC.

Mast cells are heterogeneous, multifaceted immune cells and deciphering their role and interaction with other immune cells and the adjacent epithelial cells is of the utmost importance. Increased knowledge of the MC role in the intestinal TME and of the interactions of ieMMCs and cancer cells will contribute to the improvement of strategies for curing CRC.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14092248/s1>, Figure S1: Overview of the human cohort ($n = 104$). Cohort I of $n = 17$ low-grade and $n = 12$ high-grade adenomas and $n = 22$ adenocarcinomas was extended by adenocarcinoma cohort II ($n = 53$). Grading of adenomas and carcinomas (low-grade; high-grade) was accomplished according to the current human WHO classification [46]. Figure S2: A,B: Interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs) in the intestinal mucosa of mice were not identifiable by metachromatic staining (toluidine blue). Serial sections for toluidine blue (A) and MCPT1 (B). Figure S3: Grading of murine lesions was performed according to Nolte et al., 2016 (Table S4) [45]. A–H: Murine lesions were graded as atypical hyperplasia (A,B); low-grade adenoma (C,D); high-grade adenoma (E,F); or invasive carcinoma (G,H), Figure S4: The employed semiquantitative score (0 to 5) for mucosal mast cells (ieMMCs and IpMMCs) in hotspots of murine intestinal lesions.

Corresponding to Table 1 (hpf: high-power field, 40×), Figure S5: A–F: ieMMCs (A,B) were negative for histamine (C,D), while connective tissue mast cells (CTMCs) of the intestine were positive for histamine (E,F). A,C: Murine high-grade adenoma with MCPT1⁺ ieMMCs (arrowheads) (A), which were negative for histamine in the serial section (C). B,D: Human low-grade sessile serrated adenoma with MCT⁺ ieMMCs (arrowheads) (B), which were negative for histamine in the serial section (D). E,F: CTMCs in the intestine of mice (E) and humans (F) were positive for histamine (arrows). Figure S6: A: Murine connective tissue mast cells (CMTCs) were MCPT6⁺ (MC Tryptase⁺) and appeared densely granulated and round (arrowheads). B: Lamina propria mucosal mast cells (lpMMCs, MCPT6⁺) of mice were generally slender and smaller than CTMCs (arrows). Figure S7: A–F: lpMMCs in the adenoma-carcinoma sequence of mouse (A,C,E) and intratumoral stromal MCs (ITSMCs) in the human adenoma-carcinoma sequence (B,D,F). G: Scores of lpMMCs were lower in murine hyperplastic precursor lesions than in adenomas and carcinomas (Kruskal–Wallis test, $p = 0.001$). H: Contradictorily, stromal MC scores were higher in human precursor lesions than in carcinomas (Kruskal–Wallis test, $p < 0.001$). Figure S8: A–C: Individual human intratumoral stromal mast cells (ITSMCs) appeared to be nonspecifically positive due to heparin presence as previously described [52]. A,B: MC tryptase-positive (MCT⁺) ieMMCs (A) were negative in vesicular stomatitis virus (VSV) IHC (B) and in mouse isotype IgG control (C), serving as negative IHC controls. B,C: Connective tissue mast cells (CTMCs) were occasionally positive in negative controls. Thus, MCT IHC (A) was a specific marker for human intestinal ieMMCs. Figure S9: A–F: MCPT1⁺ ieMMCs (A–C) were not coincident with MMP9⁺ cells (D–F) in serial sections. G–L: Absence (G) or presence of MCPT1⁺ ieMMCs in murine intestinal neoplasia. J–L: Luminal intestinal crypt cells were more often positive for IL-5 than basal crypt cells (J–L), but IL-5 positivity did not clearly correlate with ieMMC density (arrowheads). Table S1: Retrospectively analyzed genetically engineered mouse models (GEMMs), Table S2: Primary antibodies and IHC protocols (mouse tissue), Table S3: Primary antibodies and IHC protocols (human tissue), Table S4: Overview: Grading of mouse intestinal tumors, Table S5A: Semiquantitative evaluation of murine lamina propria mucosal mast cells (lpMMCs); B: Semiquantitative evaluation of human intratumoral stromal mast cells (ITSMCs), Table S6: Settings for computer-assisted algorithm for assessment of Ki-67 proliferation index, Table S7: Murine mast cell scores, Table S8: Human mast cell scores.

Author Contributions: Conceptualization of the study: T.G., R.S.J.S., K.M. and K.S.; Resources: M.S., M.T., T.S., C.M., S.S., B.U.S., J.R., R.R., D.S., W.W., M.J., K.M. and K.S.; Methodology: T.G., M.S., R.S.J.S., M.T., T.S., C.M., D.D., S.S., B.U.S., J.R., R.R., D.S., W.W., K.M. and K.S.; Investigation: T.G., C.M., D.D., M.J., K.M. and K.S.; Formal analysis: T.G., R.S.J.S. and K.S.; Validation: T.G. and K.S.; Visualization: T.G. and M.S.; Writing—original draft preparation: T.G.; Writing—review and editing: T.G., M.S., R.S.J.S., M.T., T.S., D.D., S.S., B.U.S., J.R., W.W., K.M. and K.S.; Software: R.S.J.S.; Funding acquisition, project administration and supervision: K.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: T.G. received a scholarship from the Cusanuswerk, Bischöfliche Studienförderung, Bonn, Germany. S.R.J.S. was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) Project-ID 395357507–SFB1371. M.T. was supported by the DFG Project-ID 395357507–SFB1371 (project P11). S.S. was supported by Stiftung für Krebs- und Scharlachforschung Mannheim: 3542.2; Roland-Ernst-Stiftung für Gesundheitswesen: RES 1/14; and DFG: WE 3548/4–1–KFO 227. B.U.S. was supported by the European Research Council-Starting Grant ERC-2016-STG-715182 and the DFG (Project-ID 360372040–SFB 1335 (project 8) and Project-ID 322359157–FOR2599 (project A3)). J.R. was supported by research grants from the DFG (Project-ID 210592381–SFB 1054; Project-ID 360372040–SFB 1335; Project-ID 395357507–SFB 1371; Project-ID 369799452–TRR 237; Project-ID 452881907–TRR 338; Project-ID 435874434–RTG 2668; RU 695/9-1; RU 695/12-1) and the European Research Council (ERC) under the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement No 834154). K.S. was supported by research grants from the DFG (Project-ID 360372040–SFB1335 (project Z01); Project-ID 395357507–SFB1371 (project Z02)).

Institutional Review Board Statement: The use of human tissue was approved by the local Ethics Committee of the Technical University of Munich/Klinikum rechts der Isar (reference number: 506/17 s). Animal experiments were approved by the local animal welfare committees: Regierung von Oberbayern, Munich, Germany, ROB-55.2-2532.Vet_02-17-79 (D.S., M.T.); Regierung von Oberbayern, Munich, Germany, ROB-55.2-2532.Vet_02-15-26, ROB-55.2-2532.Vet_02-14-86 and ROB-55.2-

2532.Vet_02-20-9 (B.S., J.R., T.S.); Regierungspräsidium Karlsruhe and Landesdirektion Sachsen, Germany, AZ G-188/11 (S.S.); UK Home Office (R.R.).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to working with diagnostic material approved by the local ethics committee of the Technical University of Munich/Klinikum rechts der Isar (reference number: 506/17 s).

Data Availability Statement: The raw data of the results presented in this study are available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank the team of the Comparative Experimental Pathology (CEP) laboratory, I. Eskina, A. Hering, A. Jacob, M. Mielke, U. Mühlthaler and O. Seelbach, for outstanding technical support. Moreover, we thank Viktoria Kehl from the Institute of Medical Informatics, Statistics and Epidemiology, Klinikum rechts der Isar, Technical University Munich for statistical advice. S.S. was generously supported by Hector Stiftung II.

Conflicts of Interest: W.W. has attended Advisory Boards and served as a speaker for Roche, MSD, BMS, AstraZeneca, Pfizer, Merck, Lilly, Boehringer, Novartis, Takeda, Bayer, Amgen, Astellas, Eisai, Illumina, Siemens, Agilent, ADC, GSK, and Molecular Health. W.W. receives research funding from Roche, MSD, BMS, and AstraZeneca. K.S. is consultant for Roche Pharma AG, member of the advisory board of TRIMT GmbH and has filed a patent on a radiopharmaceutical. All other authors declare no conflicts of interest.

References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Varricchi, G.; Galdiero, M.R.; Loffredo, S.; Marone, G.; Iannone, R.; Marone, G.; Granata, F. Are Mast Cells MASTers in Cancer? *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wu, X.; Zou, Y.; He, X.; Yuan, R.; Chen, Y.; Lan, N.; Lian, L.; Wang, F.; Fan, X.; Zeng, Y.; et al. Tumor-infiltrating mast cells in colorectal cancer as a poor prognostic factor. *Int. J. Surg. Pathol.* **2013**, *21*, 111–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yodavudh, S.; Tangjitgamol, S.; Puangsa-art, S. Prognostic significance of microvessel density and mast cell density for the survival of Thai patients with primary colorectal cancer. *J. Med. Assoc. Thai.* **2008**, *91*, 723–732.
- Gulubova, M.; Vlaykova, T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24*, 1265–1275. [[CrossRef](#)]
- Ammendola, M.; Sacco, R.; Sammarco, G.; Donato, G.; Montemurro, S.; Ruggieri, E.; Patruno, R.; Marech, I.; Cariello, M.; Vacca, A.; et al. Correlation between serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density in colo-rectal cancer patients: Possible biological-clinical significance. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99512. [[CrossRef](#)]
- Mehdawi, L.; Osman, J.; Topi, G.; Sjolander, A. High tumor mast cell density is associated with longer survival of colon cancer patients. *Acta Oncol.* **2016**, *55*, 1434–1442. [[CrossRef](#)]
- Tan, S.Y.; Fan, Y.; Luo, H.S.; Shen, Z.X.; Guo, Y.; Zhao, L.J. Prognostic significance of cell infiltrations of immunosurveillance in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11*, 1210–1214. [[CrossRef](#)]
- Malfettone, A.; Silvestris, N.; Saponaro, C.; Ranieri, G.; Russo, A.; Caruso, S.; Popescu, O.; Simone, G.; Paradiso, A.; Mangia, A. High density of tryptase-positive mast cells in human colorectal cancer: A poor prognostic factor related to protease-activated receptor 2 expression. *J. Cell Mol. Med.* **2013**, *17*, 1025–1037. [[CrossRef](#)]
- Yu, Y.; Blokhuis, B.R.; Garssen, J.; Redegeld, F.A. A Transcriptomic Insight into the Impact of Colon Cancer Cells on Mast Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1689. [[CrossRef](#)]
- Wang, S.; Li, L.; Shi, R.; Liu, X.; Zhang, J.; Zou, Z.; Hao, Z.; Tao, A. Mast Cell Targeted Chimeric Toxin Can Be Developed as an Adjunctive Therapy in Colon Cancer Treatment. *Toxins* **2016**, *8*, 71. [[CrossRef](#)]
- Segura-Villalobos, D.; Ramírez-Moreno, I.G.; Martínez-Aguilar, M.; Ibarra-Sánchez, A.; Muñoz-Bello, J.O.; Anaya-Rubio, I.; Padilla, A.; Macías-Silva, M.; Lizano, M.; González-Espinosa, C. Mast Cell-Tumor Interactions: Molecular Mechanisms of Recruitment, Intratumoral Communication and Potential Therapeutic Targets for Tumor Growth. *Cells* **2022**, *11*, 349. [[CrossRef](#)]
- Marech, I.; Ammendola, M.; Gadaleta, C.; Zizzo, N.; Oakley, C.; Gadaleta, C.D.; Ranieri, G. Possible biological and translational significance of mast cells density in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 8910–8920. [[CrossRef](#)]
- Enerbäck, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **1966**, *66*, 303–312. [[CrossRef](#)]
- Enerbäck, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 1. Effects of fixation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **1966**, *66*, 289–302. [[CrossRef](#)]
- Huntley, J.F. Mast cells and basophils: A review of their heterogeneity and function. *J. Comp. Pathol.* **1992**, *107*, 349–372. [[CrossRef](#)]

17. Vogel, P.; Janke, L.; Gravano, D.M.; Lu, M.; Sawant, D.V.; Bush, D.; Shuyu, E.; Vignali, D.A.A.; Pillai, A.; Rehg, J.E. Globule Leukocytes and Other Mast Cells in the Mouse Intestine. *Vet. Pathol.* **2018**, *55*, 76–97. [[CrossRef](#)]
18. Ahn, J.Y.; Lee, K.H.; Choi, C.H.; Kim, J.W.; Lee, H.W.; Kim, J.W.; Kim, M.K.; Kwon, G.Y.; Han, S.; Kim, S.E.; et al. Colonic mucosal immune activity in irritable bowel syndrome: Comparison with healthy controls and patients with ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* **2014**, *59*, 1001–1011. [[CrossRef](#)]
19. Heijmans, J.; Buller, N.V.; Muncan, V.; van den Brink, G.R. Role of mast cells in colorectal cancer development, the jury is still out. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 9–13. [[CrossRef](#)]
20. Toner, P.G.; Ferguson, A. Intraepithelial cells in the human intestinal mucosa. *J. Ultrastruct. Res.* **1971**, *34*, 329–344. [[CrossRef](#)]
21. Acikalin, M.F.; Oner, U.; Topçu, I.; Yaşar, B.; Kiper, H.; Colak, E. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. *Dig. Liver Dis.* **2005**, *37*, 162–169. [[CrossRef](#)]
22. Alves, I.S.; Coser, P.H.; Loureiro, G.J.; Nogueira da Gama, L.P.; Ribeiro Fda, S.; Bautz, W.G.; Coburn, K.L.; Pacheco Mda, S.; da Gama de Souza, L.N. Fibrosis and Mast Cells in Colorectal Lesions: Significance in Adenoma-Colorectal Cancer Sequence and Association with Diet. *J. Gastrointest. Cancer* **2016**, *47*, 278–286. [[CrossRef](#)]
23. Mao, Y.; Feng, Q.; Zheng, P.; Yang, L.; Zhu, D.; Chang, W.; Ji, M.; He, G.; Xu, J. Low tumor infiltrating mast cell density confers prognostic benefit and reflects immunoactivation in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 2271–2280. [[CrossRef](#)]
24. Flores de Los Rios, P.A.; Soto Domínguez, A.; Arellano-Pérez Vertti, R.D.; Castelán Maldonado, E.E.; Velázquez Gauna, S.E.; Morán Martínez, J.; Salas Treviño, D.; García Garza, R. Differential expression of mast cell granules in samples of metastatic and non-metastatic colorectal cancer in patients. *Acta Histochem.* **2020**, *122*, 151618. [[CrossRef](#)]
25. Xia, Q.; Ding, Y.; Wu, X.J.; Peng, R.Q.; Zhou, Q.; Zeng, J.; Hou, J.H.; Zhang, X.; Zeng, Y.X.; Zhang, X.S.; et al. Mast Cells in Adjacent Normal Colon Mucosa rather than Those in Invasive Margin are Related to Progression of Colon Cancer. *Chin. J. Cancer Res.* **2011**, *23*, 276–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **1990**, *61*, 759–767. [[CrossRef](#)]
27. Vogelstein, B.; Fearon, E.R.; Hamilton, S.R.; Kern, S.E.; Preisinger, A.C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A.M.; Bos, J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* **1988**, *319*, 525–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fearon, E.R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **2011**, *6*, 479–507. [[CrossRef](#)]
29. Boivin, G.P.; Washington, K.; Yang, K.; Ward, J.M.; Pretlow, T.P.; Russell, R.; Besselsen, D.G.; Godfrey, V.L.; Doetschman, T.; Dove, W.F.; et al. Pathology of mouse models of intestinal cancer: Consensus report and recommendations. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 762–777. [[CrossRef](#)]
30. Washington, M.K.; Powell, A.E.; Sullivan, R.; Sundberg, J.P.; Wright, N.; Coffey, R.J.; Dove, W.F. Pathology of rodent models of intestinal cancer: Progress report and recommendations. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 705–717. [[CrossRef](#)]
31. Jackstadt, R.; Sansom, O.J. Mouse models of intestinal cancer. *J. Pathol.* **2016**, *238*, 141–151. [[CrossRef](#)]
32. Leslie, A.; Carey, F.A.; Pratt, N.R.; Steele, R.J. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.* **2002**, *89*, 845–860. [[CrossRef](#)]
33. Rad, R.; Cadinanos, J.; Rad, L.; Varela, I.; Strong, A.; Kriegl, L.; Constantino-Casas, F.; Eser, S.; Hieber, M.; Seidler, B.; et al. A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 15–29. [[CrossRef](#)]
34. Betzler, A.M.; Kochall, S.; Blickensdörfer, L.; Garcia, S.A.; Thepkaysone, M.L.; Nanduri, L.K.; Muders, M.H.; Weitz, J.; Reissfelder, C.; Schölch, S. A Genetically Engineered Mouse Model of Sporadic Colorectal Cancer. *J. Vis. Exp.* **2017**, *125*, e55952. [[CrossRef](#)]
35. Betzler, A.M.; Nanduri, L.K.; Hissa, B.; Blickensdörfer, L.; Muders, M.H.; Roy, J.; Jesinghaus, M.; Steiger, K.; Weichert, W.; Kloor, M.; et al. Differential Effects of Trp53 Alterations in Murine Colorectal Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 808. [[CrossRef](#)]
36. Bennecke, M.; Kriegl, L.; Bajbouj, M.; Retzlaff, K.; Robine, S.; Jung, A.; Arkan, M.C.; Kirchner, T.; Greten, F.R. Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* **2010**, *18*, 135–146. [[CrossRef](#)]
37. Cheung, A.F.; Carter, A.M.; Kostova, K.K.; Woodruff, J.F.; Crowley, D.; Bronson, R.T.; Haigis, K.M.; Jacks, T. Complete deletion of Apc results in severe polyposis in mice. *Oncogene* **2010**, *29*, 1857–1864. [[CrossRef](#)]
38. Harada, N.; Tamai, Y.; Ishikawa, T.; Sauer, B.; Takaku, K.; Oshima, M.; Taketo, M.M. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* **1999**, *18*, 5931–5942. [[CrossRef](#)]
39. Leo, V.I.; Tan, S.H.; Bergmann, H.; Cheah, P.Y.; Chew, M.H.; Lim, K.H.; Ruland, J.; Reilly, P.T. CARD9 Promotes Sex-Biased Colon Tumors in the APCmin Mouse Model. *Cancer Immunol. Res.* **2015**, *3*, 721–726. [[CrossRef](#)]
40. Parang, B.; Barrett, C.W.; Williams, C.S. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1422*, 297–307. [[CrossRef](#)]
41. Madison, B.B.; Dunbar, L.; Qiao, X.T.; Braunstein, K.; Braunstein, E.; Gumucio, D.L. Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33275–33283. [[CrossRef](#)]
42. Dalton, D.K.; Pitts-Meeck, S.; Keshav, S.; Figari, I.S.; Bradley, A.; Stewart, T.A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* **1993**, *259*, 1739–1742. [[CrossRef](#)]
43. Pejler, G.; Rönnerberg, E.; Waern, I.; Wernersson, S. Mast cell proteases: Multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* **2010**, *115*, 4981–4990. [[CrossRef](#)]
44. Pejler, G.; Abrink, M.; Ringvall, M.; Wernersson, S. Mast cell proteases. *Adv. Immunol.* **2007**, *95*, 167–255. [[PubMed](#)]

45. Nolte, T.; Brander-Weber, P.; Dangler, C.; Deschl, U.; Elwell, M.R.; Greaves, P.; Hailey, R.; Leach, M.W.; Pandiri, A.R.; Rogers, A.; et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse. *J. Toxicol. Pathol.* **2016**, *29*, 1S–125S. [\[CrossRef\]](#)
46. Nagtegaal, I.; Arends, M.; Odze, R. Tumours of the Colon and Rectum: WHO classification of tumours of the colon and rectum, TNM staging of carcinomas of the colon and rectum and the Introduction. In *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System*; IARC Press: Lyon, France, 2019; pp. 157–187.
47. Meyerholz, D.K.; Beck, A.P. Fundamental Concepts for Semiquantitative Tissue Scoring in Translational Research. *ILAR J.* **2018**, *59*, 13–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Welle, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J. Leukoc. Biol.* **1997**, *61*, 233–245. [\[CrossRef\]](#)
49. Banchhead, P.; Loughrey, M.B.; Fernández, J.A.; Dombrowski, Y.; McArt, D.G.; Dunne, P.D.; McQuaid, S.; Gray, R.T.; Murray, L.J.; Coleman, H.G.; et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16878. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Breiman, L. Random Forests. *Mach. Learn.* **2001**, *45*, 5–32. [\[CrossRef\]](#)
51. Steiger, K.; Ballke, S.; Yen, H.Y.; Seelbach, O.; Alkhamas, A.; Boxberg, M.; Schwamborn, K.; Knolle, P.A.; Weichert, W.; Mogler, C. Histopathological research laboratories in translational research: Conception and integration into the infrastructure of pathological institutes. *Pathologie* **2019**, *40*, 172–178. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Schiltz, P.M.; Lieber, J.; Giorno, R.C.; Claman, H.N. Mast cell immunohistochemistry: Non-immunological immunostaining mediated by non-specific F(ab')₂-mast cell secretory granule interaction. *Histochem. J.* **1993**, *25*, 642–647. [\[CrossRef\]](#)
53. Salomonsson, M.; Malinowski, A.; Kalm-Stephens, P.; Dahlin, J.S.; Janson, C.; Alving, K.; Hallgren, J. Circulating mast cell progenitors correlate with reduced lung function in allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy* **2019**, *49*, 874–882. [\[CrossRef\]](#)
54. Menzies-Gow, A.; Ying, S.; Phipps, S.; Kay, A.B. Interactions between eotaxin, histamine and mast cells in early microvascular events associated with eosinophil recruitment to the site of allergic skin reactions in humans. *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34*, 1276–1282. [\[CrossRef\]](#)
55. Elsaiey, A.; Mahmoud, H.S.; Jensen, C.T.; Klimkowski, S.; Taher, A.; Chaudhry, H.; Morani, A.C.; Wong, V.K.; Salem, U.I.; Palmquist, S.M.; et al. Mastocytosis-A Review of Disease Spectrum with Imaging Correlation. *Cancers* **2021**, *13*, 5102. [\[CrossRef\]](#)
56. Schwartz, L.B. Mast cells: Function and contents. *Curr. Opin. Immunol.* **1994**, *6*, 91–97. [\[CrossRef\]](#)
57. Weidner, N.; Austen, K.F. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol. Res. Pract.* **1993**, *189*, 156–162. [\[CrossRef\]](#)
58. Enerbäck, L. Mucosal mast cells in the rat and in man. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1987**, *82*, 249–255. [\[CrossRef\]](#)
59. Gounaris, E.; Erdman, S.E.; Restaino, C.; Gurish, M.F.; Friend, D.S.; Gounari, F.; Lee, D.M.; Zhang, G.; Glickman, J.N.; Shin, K.; et al. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19977–19982. [\[CrossRef\]](#)
60. Bischoff, S.C.; Wedemeyer, J.; Herrmann, A.; Meier, P.N.; Trautwein, C.; Cetin, Y.; Maschek, H.; Stolte, M.; Gebel, M.; Manns, M.P. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* **1996**, *28*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
61. Takanami, I.; Takeuchi, K.; Naruke, M. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* **2000**, *88*, 2686–2692. [\[CrossRef\]](#)
62. Johansson, A.; Rudolfsson, S.; Hammarsten, P.; Halin, S.; Pietras, K.; Jones, J.; Stattin, P.; Egevad, L.; Granfors, T.; Wikström, P.; et al. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *Am. J. Pathol.* **2010**, *177*, 1031–1041. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Kessler, D.A.; Langer, R.S.; Pless, N.A.; Folkman, J. Mast cells and tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* **1976**, *18*, 703–709. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Sinnamon, M.J.; Carter, K.J.; Sims, L.P.; Lafleur, B.; Fingleton, B.; Matrisian, L.M. A protective role of mast cells in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 880–886. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Ammendola, M.; Patruno, R.; Sacco, R.; Marech, I.; Sammarco, G.; Zuccala, V.; Luposella, M.; Zizzo, N.; Gadaleta, C.; Porcelli, M.; et al. Mast cells positive to tryptase and tumour-associated macrophages correlate with angiogenesis in locally advanced colorectal cancer patients undergone to surgery. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 533–540. [\[CrossRef\]](#)
66. Yu, Y.; Blokhuis, B.R.J.; Diks, M.A.P.; Keshavarzian, A.; Garssen, J.; Redegeld, F.A. Functional Inhibitory Siglec-6 Is Upregulated in Human Colorectal Cancer-Associated Mast Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2138. [\[CrossRef\]](#)
67. Sammarco, G.; Gallo, G.; Vescio, G.; Picciariello, A.; De Paola, G.; Trompetto, M.; Currò, G.; Ammendola, M. Mast Cells, microRNAs and Others: The Role of Translational Research on Colorectal Cancer in the Forthcoming Era of Precision Medicine. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2852. [\[CrossRef\]](#)
68. Komi, D.E.A.; Redegeld, F.A. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *58*, 313–325. [\[CrossRef\]](#)
69. Wroblewski, M.; Bauer, R.; Cubas Córdova, M.; Udonta, F.; Ben-Batalla, I.; Legler, K.; Hauser, C.; Egberts, J.; Janning, M.; Velthaus, J.; et al. Mast cells decrease efficacy of anti-angiogenic therapy by secreting matrix-degrading granzyme B. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 269. [\[CrossRef\]](#)

70. Ammendola, M.; Sacco, R.; Sammarco, G.; Luposella, M.; Patrino, R.; Gadaleta, C.D.; Sarro, G.D.; Ranieri, G. Mast Cell-Targeted Strategies in Cancer Therapy. *Transfus. Med. Hemother.* **2016**, *43*, 109–113. [\[CrossRef\]](#)
71. Saadalla, A.; Lima, M.M.; Tsai, F.; Osman, A.; Singh, M.P.; Linden, D.R.; Dennis, K.L.; Haeryfar, S.M.M.; Gurish, M.F.; Gounari, F.; et al. Cell Intrinsic Deregulated β -Catenin Signaling Promotes Expansion of Bone Marrow Derived Connective Tissue Type Mast Cells, Systemic Inflammation, and Colon Cancer. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2777. [\[CrossRef\]](#)
72. Newlands, G.F.; Gibson, S.; Knox, D.P.; Grecnis, R.; Wakelin, D.; Miller, H.R. Characterization and mast cell origin of a chymotrypsin-like proteinase isolated from intestines of mice infected with *Trichinella spiralis*. *Immunology* **1987**, *62*, 629–634.
73. Scudamore, C.L.; McMillan, L.; Thornton, E.M.; Wright, S.H.; Newlands, G.F.; Miller, H.R. Mast cell heterogeneity in the gastrointestinal tract: Variable expression of mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) in intraepithelial mucosal mast cells in nematode-infected and normal BALB/c mice. *Am. J. Pathol.* **1997**, *150*, 1661–1672.
74. de Souza Junior, D.A.; Santana, A.C.; da Silva, E.Z.; Oliver, C.; Jamur, M.C. The Role of Mast Cell Specific Chymases and Tryptases in Tumor Angiogenesis. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 142359. [\[CrossRef\]](#)
75. Dougherty, R.H.; Sidhu, S.S.; Raman, K.; Solon, M.; Solberg, O.D.; Caughey, G.H.; Woodruff, P.G.; Fahy, J.V. Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique protease phenotype in T(H)2-high asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, 1046–1053. [\[CrossRef\]](#)
76. Lai, Y.; Altemeier, W.A.; Vandree, J.; Piliponsky, A.M.; Johnson, B.; Appel, C.L.; Frevert, C.W.; Hyde, D.M.; Ziegler, S.F.; Smith, D.E.; et al. Increased density of intraepithelial mast cells in patients with exercise-induced bronchoconstriction regulated through epithelially derived thymic stromal lymphopoietin and IL-33. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 1448–1455. [\[CrossRef\]](#)
77. Saadalla, A.M.; Osman, A.; Gurish, M.F.; Dennis, K.L.; Blatner, N.R.; Pezeshki, A.; McNagny, K.M.; Cheroutre, H.; Gounari, F.; Khazaie, K. Mast cells promote small bowel cancer in a tumor stage-specific and cytokine-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 1588–1592. [\[CrossRef\]](#)
78. Barsouk, A.; Rawla, P.; Barsouk, A.; Thandra, K.C. Epidemiology of Cancers of the Small Intestine: Trends, Risk Factors, and Prevention. *Med. Sci.* **2019**, *7*, 46. [\[CrossRef\]](#)
79. Yamaguchi, T.; Nishijima, M.; Tashiro, K.; Kawabata, K. Wnt- β -Catenin Signaling Promotes the Maturation of Mast Cells. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 2048987. [\[CrossRef\]](#)
80. Zhang, X.; Gaspard, J.P.; Chung, D.C. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6050–6054.
81. Hlubek, F.; Brabletz, T.; Budczies, J.; Pfeiffer, S.; Jung, A.; Kirchner, T. Heterogeneous expression of Wnt/ β -catenin target genes within colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 1941–1948. [\[CrossRef\]](#)
82. Gruber, B.L.; Marchese, M.J.; Kew, R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* **1995**, *86*, 2488–2493. [\[CrossRef\]](#)
83. Grimbaldston, M.A.; Chen, C.C.; Piliponsky, A.M.; Tsai, M.; Tam, S.Y.; Galli, S.J. Mast cell-deficient W-sh/c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 835–848. [\[CrossRef\]](#)
84. Sasaki, H.; Imanishi, M.; Fujikura, D.; Sugiyama, M.; Tanimoto, K.; Mochiji, Y.; Takahashi, Y.; Hiura, K.; Watanabe, M.; Kashimoto, T.; et al. New inducible mast cell-deficient mouse model (Mcpt5/Cma1 (DTR)). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *551*, 127–132. [\[CrossRef\]](#)
85. Feyerabend, T.B.; Weiser, A.; Tietz, A.; Stassen, M.; Harris, N.; Kopf, M.; Radermacher, P.; Möller, P.; Benoist, C.; Mathis, D.; et al. Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* **2011**, *35*, 832–844. [\[CrossRef\]](#)
86. Heger, K.; Seidler, B.; Vahl, J.C.; Schwartz, C.; Kober, M.; Klein, S.; Voehringer, D.; Saur, D.; Schmidt-Supprian, M. CreER(T2) expression from within the c-Kit gene locus allows efficient inducible gene targeting in and ablation of mast cells. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 296–306. [\[CrossRef\]](#)

IV WEITERE ERGEBNISSE

1 Interepitheliale Mastzellen feliner intestinaler Neoplasien

In den felinen intestinalen Karzinomen waren eosinophil granulierte, mit TB metachromatisch anfärbbare, zytoplasmatisch Histamin- sowie MZT-positive, interepitheliale Zellen detektierbar, welche der Topografie und Morphologie der murinen ieMMZ entsprachen. In den 2 untersuchten felinen Adenomen waren keine ieMMZ visualisierbar. Daneben waren gelegentlich feline GLs (ESTEVEES et al., 2000) in den untersuchten Karzinomen aufzufinden, diese waren jedoch in der immunhistochemischen Untersuchung MZT-negativ (Abbildung 4).

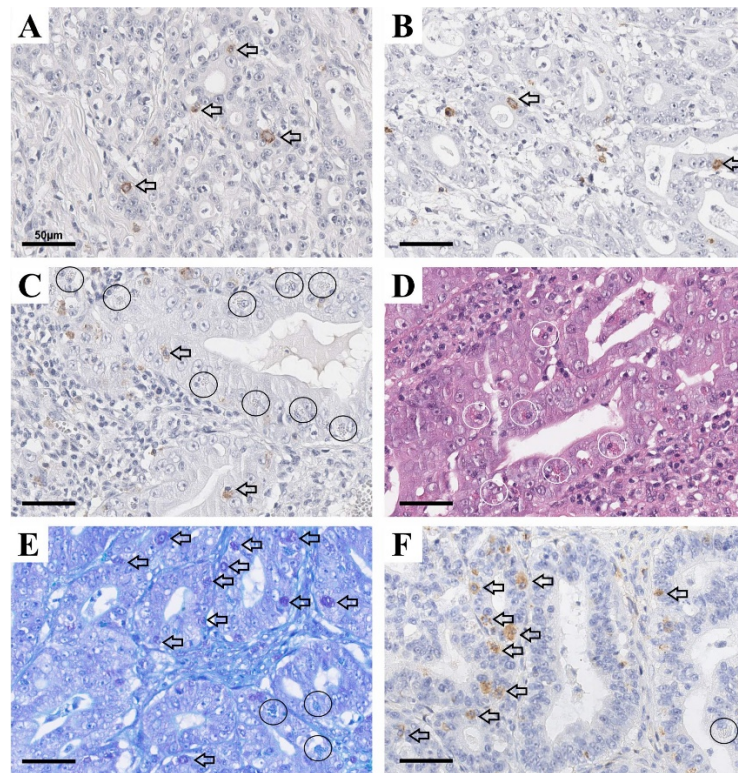


Abbildung 4 |(A-C) Mastzell-Tryptase (MZT)-Immunhistochemie (IHC) feliner intestinaler Karzinome. Feline ieMMZ sind MZT-positiv (Pfeile). (C) Demgegenüber stellen sich, gelegentlich im karzinomatösen Darmgewebe sichtbare, interepithelial gelegene, feline Globule Leucocytes (GLs) MZT-negativ dar (Kreise). (D) In der HE-Färbung färben sich die Granula feline GLs deutlich eosinophil an (Kreise), während ieMMZ nicht spezifisch darstellbar sind. (E) In der Toluidinblaufärbung stellen sich feline ieMMZ metachromatisch (violett) dar (Pfeile), GLs zeigen keine Metachromasie (Kreise). (F) In der Histamin-IHC sind feline ieMMZ positiv (Pfeile), feline GLs sind negativ (Kreis).

Interepitheliale MZ waren in felines high-grade Adenomen immunhistochemisch nicht nachweisbar, während sie in Karzinomen selten gehäuft auftraten (MZT⁺ ieMMZ in felines Karzinomen: 87,8 % Score 0; 8,2 % Score 1; 4,1 % Score 2). Stromale MZ (IpMMZ und BGMZ) waren sowohl in felines high-grade Adenomen als auch in Karzinomen in moderater Zahl vorhanden (MZT⁺ stromale MZ in felines Adenomen und Karzinomen: 51 % Score 0; 45,1 % Score 1; 3,9 % Score 2) (Abbildung 5).

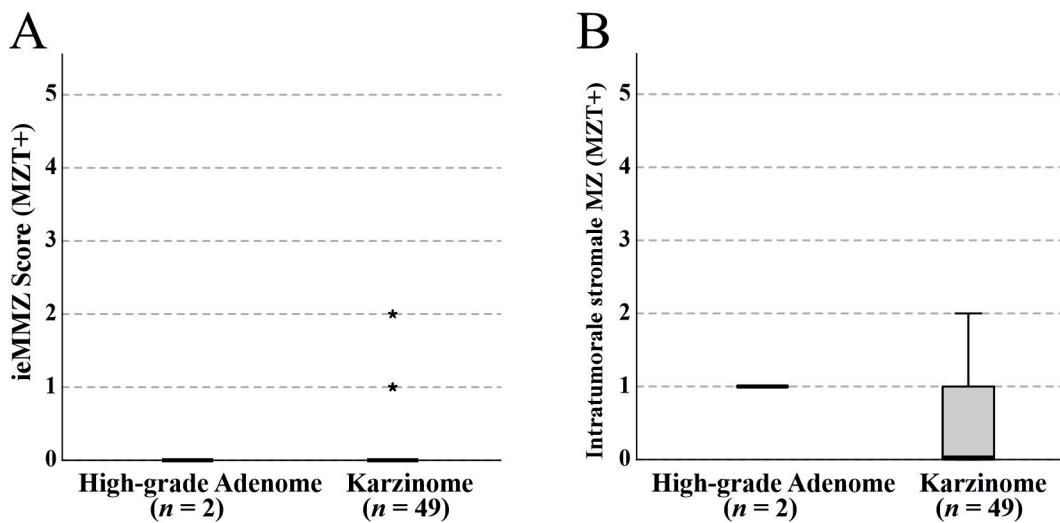


Abbildung 5 | Mann-Whitney-U-Test für MZ-Scores felines intestinaler high-grade Adenome und Karzinome. (A) Mastzell-Tryptase positive (MZT⁺) ieMMZ-Infiltration ($p = 0.794$). (B) MZT⁺ stromale MZ-Infiltration ($p = 0.285$). *Extremer statistischer Ausreißer ($> 3 \cdot IQA$).

2 Speziesvergleichende Mastzellinfiltration intestinaler Neoplasien

Speziesvergleichend ließ sich feststellen, dass generell in allen evaluierten, felines und humanen (prä-)neoplastischen Läsionen weniger, diffus infiltrierende ieMMZ detektierbar waren (Median 0), während in den murinen Läsionen mehr ieMMZ akkumulierten, welche sich vorwiegend in Clustern anordneten (Median 1) (Abbildung 6A). Derselbe Trend war für die Karzinomkohorten ersichtlich, hier war die ieMMZ-Infiltration der felines und humanen Gruppe ähnlich niedrig und kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Katze und Mensch vorhanden (Abbildung 6B).

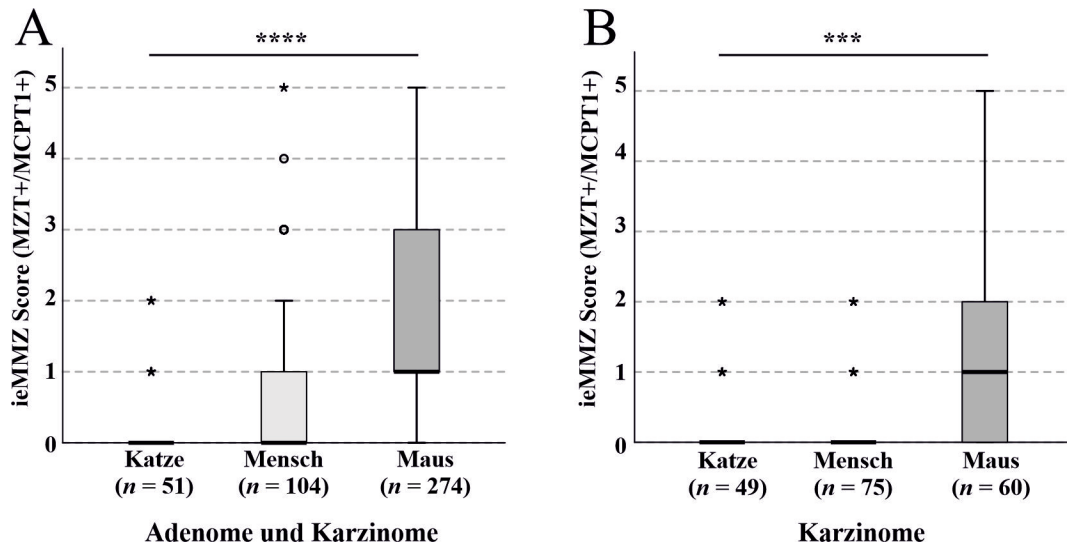


Abbildung 6 | Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test für den Speziesvergleich der intratumoralen ieMMZ Scores (human und felin MZT⁺ bzw. murin MCPT1⁺). (A) Vergleich der ieMMZ-Scores der Gesamtheit evaluierter (Prä-)Neoplasien. In felinen intestinalen (Prä-)Neoplasien (high- und low-grade Adenomen, Karzinomen) waren generell weniger intratumorale ieMMZ detektierbar als in den humanen und murinen. Murine Läsionen wiesen die stärkste neoplastische ieMMZ-Infiltration auf (**** $p \leq 0.0001$). (B) Vergleich der Infiltration intestinaler Karzinome durch ieMMZ in den 3 Spezies. Mäuse wiesen dabei eine höhere, Menschen und Katzen im Vergleich dazu eine statistisch signifikant niedrigere ieMMZ-Infiltration auf (*** $p \leq 0.001$). *Extreme statistische Ausreißer ($> 3 \cdot \text{IQA}$); °milde statistische Ausreißer ($1,5\text{-}3 \cdot \text{IQA}$).

V DISKUSSION

1 Morphologischer und molekularer Vergleich feliner und humaner intestinaler Karzinome

In Ermangelung eines dezidierten Klassifikationsschemas für spontane feline intestinale Neoplasien wurde im ersten Teil dieser Doktorarbeit zunächst eine vergleichende pathologische Charakterisierung feliner Tumore nach Vorbild der humanen WHO-Klassifikation für Tumore des Kolons und Rektums (NAGTEGAAL et al., 2019) vorgenommen. Die potenzielle Eignung der Katze als *in vivo* Modell humaner intestinaler Neoplasien wurde im Rahmen der Studie I „*Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas*“ (Kapitel III.1) untersucht.

Die (immun-)histochemische und molekularpathologische Aufarbeitung einer Kohorte feliner intestinaler Karzinome ($n = 49$) und deren Vergleich mit einer großen Kohorte humaner Kolonkarzinome ($n = 1004$) (JESINGHAUS et al., 2021) zeigte prominente Parallelen zwischen der histomorphologischen Erscheinung feliner und humaner intestinaler Neoplasien. Kolonkarzinome der Katze wurden erstmalig basierend auf der humanen, histologischen WHO-Subtypisierung nach Nagtegaal et al. (2019) klassifiziert. Des Weiteren waren die felinen Karzinome mehrheitlich undifferenziert (high grade), wuchsen hochinvasiv und sehr dissoziiert, d.h. mit hoher Tumor Buddingaktivität (84.3 % der Kolonkarzinome Bd3). Das klassische Adenokarzinom (*Adenocarcinoma not otherwise specified* (ANOS)) war, wie im humanen Kontext (JESINGHAUS et al., 2021), auch in der felinen Kohorte der am häufigsten vorkommende WHO-Subtyp (59,2 %) und zeigte im Vergleich mit dem serratierten Adenokarzinom (SAC) eine höhere histologische Invasivität (vaskulär, lymphatisch, perineural und serosal infiltrierend). Auffälligerweise war das SAC als zweithäufigster Subtyp in der felinen Kohorte (26,5 %) im Vergleich zur humanen Kohorte überrepräsentiert. Des Weiteren waren den Wnt/ β -Catenin-Signalweg betreffende Mutationen des *CTNNB1*-Gens in 4 felinen Karzinomen, welche immunhistochemisch eine nukleäre Translokation von β -Catenin aufwiesen, mittels Sanger-Sequenzierung nachweisbar.

Daraus kann geschlossen werden, dass spontane, feline intestinale Karzinome das

humane Gegenstück sehr gut, in ihrer histomorphologischen Struktur und Invasivität sogar besser als das Mausmodell, abbilden. Sie wurden so als ein vielversprechendes *in vivo* Modell für das humane KRK identifiziert. Diese potenzielle Eignung soll im Folgenden diskutiert werden.

In der tiermedizinischen Praxis werden spontan auftretende intestinale Karzinome bei feline Patienten im klinischen Alltag zwar seltener als Lymphome, aber dennoch regelmäßig diagnostiziert (RISSETTO et al., 2011; SCHWITTLICK et al., 2020), wenngleich bis heute veterinärmedizinisch für diese hoch aggressive Tumortart keine kurative Therapie verfügbar ist (HAMMER & KESSLER, 2005; CZAJKOWSKI et al., 2022). In der Humanmedizin werden Adenome als Vorstufen maligner Darmkarzinome im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz bei turnusmäßigen, prophylaktischen Koloskopien erkannt und reseziert (KEUM & GIOVANNUCCI, 2019). Demgegenüber sind für die Katze sehr selten Vorläuferläsionen in Form von intestinalen Adenomen beschrieben (UNEYAMA et al., 2021a). Diese Seltenheit ist wahrscheinlich durch ein nicht stattfindendes Screening in Form koloskopischer Untersuchungen begründet. Deshalb konnten in dieser Arbeit nur eine relativ geringe Zahl ($n = 2$) feline Adenome untersucht werden.

Wie in der ersten Studie gezeigt wurde, erscheinen invasive feline Darmkarzinome als *in vivo* Modell für humane Kolonkarzinome vielversprechend, da sie häufig dem humanen invasiven *late-stage* Kolonkarzinom entsprechen und dessen Heterogenität histologisch und molekularpathologisch sehr gut abbilden. Molekularpathologisch wurden feline intestinale Tumore jedoch bislang nur partiell (z.B. *KRAS*-Sequenzierung) untersucht. Dabei wurden *KRAS*-Mutationen als pathogenetisch relevant identifiziert (UNEYAMA et al., 2021b). In Übereinstimmung mit dieser früheren Studie war auch in der eigenen feline Karzinomkohorte das SAC auffällig häufig, was die von Uneyama et al. (2021) aufgestellte These der besonderen Relevanz des serratierten Karzinogenese Pfades bei der Pathogenese feline kolorektaler Karzinome untermauert (UNEYAMA et al., 2021b). Die weiterführende Kenntnis von Hotspots im feline Genom, welche bislang aufgrund mangelnder molekularer Untersuchungen noch rudimentär ist, jedoch für die erfolgreiche Inklusion feline Patienten in zukünftige klinische Studien von großer Wichtigkeit, bleibt ausstehend. Der im Rahmen der Studie I publizierte, erstmalige Nachweis von Mutationen des feline *CTNNB1*-Gens mittels Sanger-Sequenzierung trägt zur weiteren Entschlüsselung des genetischen Hintergrundes feline intestinaler Karzinome bei. Der

Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist im Rahmen der humanen Karzinogenese am häufigsten alteriert (YAEGER et al., 2018). Es zeigte sich, dass, im Gegensatz zur Annahme von Uneyama et al. (2021) (UNEYAMA et al., 2021b), eine Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auch in feline Darmkarzinomen von pathogenetischer Relevanz ist. Weiterhin wäre eine *APC*-Gensequenzierung, sinnvollerweise in Form einer Panelsequenzierung oder eines Whole Genome Sequencing, zukünftig wegweisend, um die der feline intestinalen Karzinogenese zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weiter aufzuklären.

Das genetisch gezielt veränderte Mausmodell (GEMM) stellt bis heute den Goldstandard bei der experimentellen Erforschung der humanen intestinalen Karzinogenese dar, und das obwohl, im Gegensatz zum Menschen, die Neoplasien endogener GEMM (z.B. *Apc*^{Min/+} Modell) oft (auch) im Dünndarm lokalisiert sind (JACKSTADT & SANSOM, 2016). Darüber hinaus entwickeln Mäuse zwar eine große Anzahl an intestinalen Läsionen, diese verbleiben jedoch im Adenomstadium und weisen weniger invasive Charakteristika wie z.B. Tumor Budding oder Metastasierung auf (WASHINGTON et al., 2013; JACKSTADT & SANSOM, 2016; GEORGES et al., 2019). Das Mausmodell erlaubt zwar die Effekte isolierter Faktoren, wie z.B. die Rolle bestimmter Gene, spezifisch zu untersuchen, jedoch kann das humane Kolonkarzinom in der, in Laborumgebung weitestgehend steril gehaltenen, Maus nicht in seiner naturgemäßen Komplexität und Heterogenität abgebildet werden (CHEON & ORSULIC, 2011). Dies, sowie prädisponierende Faktoren, wie z.B. fleischreiche Ernährung und Umwelteinflüsse, experimentell zu modellieren ist in Hinblick auf zunehmende Therapieresistenzen und Rezidive jedoch von großer Bedeutung (MCINTYRE et al., 2015). Haustiere, wie die Katze, teilen i.d.R. den menschlichen Lebensraum. Sie sind also ähnlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt, und zugleich, im Gegensatz zu vielen GEMM, vollständig immunkompetent. Ob sich auch hinsichtlich des immunologischen TMM Parallelen zwischen Katze und Mensch zeigen, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

Wenngleich in der hier durchgeführten Studie keine Überlebensdaten feliner Patienten erhoben und somit keine prognostischen Implikationen abgeleitet werden konnten, bleibt zu bemerken, dass die Korrelation bestimmter feliner Subtypen (A-NOS, muzinöses Adenokarzinom) mit höherem histologischen Invasivitätsgrad auf eine potenziell unkompliziert erhebbare, prognostische Aussage histologischer

Subtypisierung in der veterinärpathologischen Diagnostik hinweist. Durch Aktualisierung der veterinärmedizinischen WHO (HEAD et al., 2003) einschließlich einer Angleichung an die humane WHO-Klassifikation (NAGTEGAAL et al., 2019) könnte einerseits eine Standardisierung veterinärpathologischer Diagnostik, andererseits eine Annäherung an die zukunftsweisende Idee der komparativen Onkologie erreicht werden.

Hierbei geht es darum, spontan erkrankte Haustiere als natürlich vorkommende Kohorten in klinische Studien einzuschließen. Auch wenn bis dato v.a. der Hund als Modell für verschiedene neoplastische Erkrankungen (z.B. Melanom, Osteosarkom, Mammakarzinom) ins Feld geführt wird (LEBLANC et al., 2016; LEBLANC & MAZCKO, 2020), kann die Katze hier ebenso in Betracht gezogen werden (CANNON, 2015; ADEGA et al., 2016). Im Sinne der vergleichenden Onkologie sollten primär, durch die Nutzung von felinem Gewebematerial, welches bspw. im Rahmen veterinärmedizinischer Einsendungsdiagnostik zur Verfügung steht, Pathogenesemechanismen in räumlicher Auflösung identifiziert, und Parallelen oder Diskrepanzen zur humanen Situation aufgedeckt werden. Nachfolgend könnten, in Ergänzung konventionellen, (toxiko-)pathologischen präklinischen Studien, durch den Einschluss von Katzen mit spontan auftretenden Neoplasien in klinische Studien, wertvolle *in vivo* Daten generiert werden.

Insbesondere hinsichtlich invasiver Charakteristika und des häufigen Vorkommens des SAC scheinen Katzen potenziell einen vielversprechenden Beitrag zur Weiterentwicklung humaner (individualisierter) Therapeutika leisten zu können. Zukünftig könnte die weiterführende Untersuchung und morphologische, immunhistochemische sowie molekulare Charakterisierung feliner Karzinomkohorten weitere interessante Parallelen (z.B. hinsichtlich des Mikrosatellitenstatus) offenlegen. Nicht zuletzt könnten sich hierdurch neue therapeutische Optionen für die Behandlung des, trotz adjuvanter Chemotherapie zumeist rapide tödlich verlaufenden, felinen KRK (CZAJKOWSKI et al., 2022) eröffnen. Die Ähnlichkeit von humanem und felinem Darmkrebs wurde im Rahmen der Publikation I nicht nur histomorphologisch, sondern erstmals hinsichtlich eines vergleichbaren *CTNNB1*-Mutationsstatus auch molekularpathologisch gezeigt.

2 Vergleichende Studie zur Rolle interepithelialer Mastzellen im Verlauf der intestinalen Adenom-Karzinom-Sequenz

Die murine ieMMZ wurde von Vogel et al. (2018) im Intestinum verschiedener Mausmodelle (darmgesund sowie nematodeninfiziert) beschrieben und mittels ihrer spezifischen Proteasenausstattung (MCPT1) immunhistochemisch von IpMMZ und BGMZ abgegrenzt (VOGEL et al., 2018). Eine Beschreibung von ieMMZ im humanen und felinen Intestinum erfolgte bis dato vereinzelt (human) (TONER & FERGUSON, 1971; ALVES et al., 2016) bzw. nicht konkret (felin) (TAKEUCHI et al., 1969). Einige Autoren benannten die MMZ innerhalb des Epithels als „intra“epitheliale MZ, im Sinne einer Lokalisation innerhalb der Epithelzellschicht (TONER & FERGUSON, 1971; FRIEND et al., 1996; SCUDAMORE et al., 1997; GOUNARIS et al., 2007). Um die Separation der MMZ, d.h. ihre interzelluläre Lage zwischen den intestinalen Epithelzellen (nicht innerhalb der Epithelzellen), deutlich herauszustellen, schließt sich diese Arbeit mit der Benennung von ieMMZ als „inter“epitheliale MMZ der Ausführung von Vogel et al. (2018) an.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die zuverlässige und vergleichende immunphänotypische Subtypisierung und Identifizierung von MMZ-Subtypen, schwerpunktmäßig der ieMMZ, im Intestinum von Maus sowie Mensch und Katze. Darauf basierend erfolgte die Entwicklung eines semiquantitativen Scoringsystems für interepitheliale und stromale MZ-Infiltrationen in intestinalen (Prä-)Neoplasien (siehe Kapitel XIII.2.6.3).

In der eigenen Studie II „*Comparative Study of the Role of Interepithelial Mucosal Mast Cells in the Context of Intestinal Adenoma-Carcinoma Progression*“ (Kapitel III.2) wurde gezeigt, dass im intestinalen Epithel lokalisierte MMZ in (Prä-)Neoplasien von Maus und Mensch eindeutig akkumulieren. Der immunhistochemische Nachweis von ieMMZ gelang im murinen Darm mittels der Marker MCPT1 (eine MZC (PEJLER et al., 2010)) und MCPT6 (eine MZT (PEJLER et al., 2010)), im humanen Darm mittels der Marker MZT und MZC. Während sich die ieMMZ in intestinalen Läsionen der Maus bevorzugt in Clustern anordneten, waren sie in humanen Läsionen vornehmlich diffus verteilt.

Vogel et al. (2018) identifizierten in ihrer Studie MCPT1 ebenfalls als ieMMZ-spezifischen Marker, jedoch misslang ihnen der ieMMZ-Nachweis mittels MZT-

IHC. Sie untersuchten eine Reihe von Mausmodellen (gesund und nematodeninfiziert), jedoch nicht das Vorkommen von ieMMZ vor dem Hintergrund intestinaler Neoplasien (VOGEL et al., 2018). In der eigenen Studie war ein positives Signal neoplasieassoziiertes ieMMZ in der MZT-IHC feststellbar. Während ieMMZ bei Nematodeninfektionen vermehrt MCPT1 (MZC) exprimieren und so zu einer antiparasitären Immunantwort beitragen (SCUDAMORE et al., 1997), deutet die gesteigerte Expression von MCPT 6 (MZT) auf eine wahrscheinlich differierende Funktionalität von ieMMZ im Rahmen intestinaler Neoplasien hin. Mutmaßlich wirken sich MZT-medierte, pro-tumorigene Effekte der ieMMZ im intestinalen TMM direkt auf die benachbarten Tumorzellen aus. Offen bleibt, wie und ob das TMM bzw. die Tumorzellen selbst den ieMMZ-Phänotyp beeinflussen kann bzw. können.

Auch in der Katze waren in intestinalen Karzinomen ieMMZ immunhistochemisch visualisierbar. Die MZT-Positivität stimmte mit den murinen und humanen ieMMZ-Charakteristika überein. Feline ieMMZ waren zudem immunhistochemisch Histamin-positiv und stellten sich mittels TB metachromatisch dar. Dies spricht, neben hohem Histamin-, auch für einen hohen Heparin Gehalt der feline ieMMZ. Die metachromatische Anfärbung von murinen und humanen ieMMZ gelang dagegen mit TB nicht, was auf einen fehlenden bzw. relativ geringfügigen Heparin Gehalt zurückzuführen ist (WELLE, 1997). In der Literatur wird für feline GLs ein mastzellulärer oder lymphozytärer Ursprung diskutiert (TAKEUCHI et al., 1969). Basierend auf den eigenen histochemischen (TB-negativ) und immunhistochemischen Untersuchungen (Tryptase- und Histamin-negativ) sind feline intestinale GLs sehr wahrscheinlich nicht den ieMMZ gleichzusetzen, wie im murinen Kontext von Vogel et al. (2018) vorgeschlagen (VOGEL et al., 2018). Neben der limitierten Anzahl zur Verfügung stehender feline Adenome, war die eingeschränkte Verfügbarkeit feline IHC-Marker eine weitere Schwierigkeit. So war die Etablierung eines MZC-Markers auf feline FFPE-Gewebe nicht erfolgreich.

Lamina propria-assoziierte MMZ (lpMMZ) der Maus waren immunhistochemisch mittels MCPT6- und Granzym B-AK, sowie topografisch (in der Lamina propria liegend) und morphologisch (kleine, oftmals elongierte Zellform) eindeutig identifizierbar. Sie können somit von den größeren BGMZ der Submukosa, der Tunica muscularis und des Fettgewebes klar differenziert werden (VOGEL et al., 2018).

Diese stringente, morphologische Differenzierung gelang in den heterogenen, regelmäßig sehr viel dissoziierter und invasiver (die Tunica muscularis durchbrechend) wachsenden humanen bzw. felines Karzinomen nicht zuverlässig. Daher wurden außerhalb des Epithels, zwischen neoplastischen Zellkomplexen liegende, MZ in den Spezies *Felis catus* und *Homo sapiens* nicht als IpMMZ, sondern als stromale MZ kategorisiert, da eine Inklusion von dazwischenliegenden BGMZ nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnte.

Differenzen zwischen murinen und humanen MZ-Charakteristika sind bekannt. Aufgrund dessen ist ein direkter Transfer von Forschungserkenntnissen über MZ, welche im Mausmodell erlangt wurden, auf den humanen Organismus nicht uneingeschränkt möglich (BISCHOFF, 2007). Ein Beispiel für diese Differenzen ist die verschiedenartige Klassifikation der murinen bzw. humanen MZ in MMZ und BGMZ bzw. MZ_T und MZ_{TC} (WELLE, 1997). Mit der eigenen Studie sollte ein Vergleich und Transfer des von Vogel et al. (2018) jüngst definierten ieMMZ-Subtyps auf den Menschen und die Katze angestellt werden.

Speziesvergleichend lässt sich feststellen, dass intratumorale murine ieMMZ am häufigsten MZC (MCPT1)-positiv waren, während die humanen ieMMZ sich häufiger MZT-positiv darstellten. Flores de los Rios et al. (2020) beschreiben übereinstimmend, dass humane MZ_T häufiger als MZ_C in invasivem, metastasierendem humanen Dickdarmkrebs auftreten (FLORES DE LOS RIOS et al., 2020). Diese unterschiedliche gewichtete Proteasenausstattung zeigt eine mögliche Differenz des murinen und humanen ieMMZ-Subtyps auf. Da innerhalb des TMM sowohl die MZT als auch die MZC pro-tumorigene bzw. pro-angiogene und pro-invasive, die MZC jedoch daneben auch anti-tumorigene (immunzellaktivierende) Effekte entfalten kann, könnte sich die Funktionalität der ieMMZ zwischen Mausmodell und Mensch unterscheiden. Die eigenen, deskriptiven Daten weisen darauf hin, dass sich im Mausmodell erlangte immunologische Erkenntnisse, speziell zur ieMMZ-Infiltration im KRK, nicht ohne Weiteres auf die menschliche Situation translatieren lassen.

Das Auftreten von MZT⁺ und MZC⁺ ieMMZ in humanen intestinalen (Prä-)Neoplasien und MZT⁺ und Histamin⁺ ieMMZ in felines Karzinomen wurde in der eigenen Studie, als eine Parallele zur Akkumulation von MCPT1⁺ und MCPT6⁺ ieMMZ in murinen intestinalen Läsionen, erstmals beschrieben und näher unter-

sucht. Auch wenn, wie oben erwähnt, eine Eins-zu-eins-Translation nicht angestrebt werden sollte, weist diese speziesübergreifende Präsenz der ieMMZ im Rahmen der intestinalen Karzinogenese auf deren funktionelle, karzinogene Relevanz hin.

Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Dynamik der Zahl infiltrierender MMZ-Subtypen im Verlauf der intestinalen Karzinogenese (Adenom-Karzinom-Progression) analysiert und verglichen. Zunächst wurde durch die Applikation bereits bestehender, standardisierter Klassifikationssysteme (NOLTE et al., 2016; NAGTEGAAL et al., 2019) ein komparatives Grading experimentell induzierter (Maus) bzw. spontaner intestinaler Adenome und Karzinome (Mensch und Katze) erreicht. Auf Basis dessen erfolgte anschließend das Scoring von o.g., immunhistochemisch subtypisierten MMZ-Populationen auf konsekutiven Schnitten pro intestinaler Läsion (Hyperplasie; low-grade Adenom; high-grade Adenom, Karzinom). Der Fokus lag hierbei auf dem semiquantitativen Scoring von MMZ-Subtypen (siehe Kapitel XIII.2.6.3) im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz.

Ein methodischer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der *State-of-the-art*-Charakterisierung intestinaler Adenome und Karzinome von Maus, Mensch und Katze. Vor allem im murinen Kontext wurde in früheren Studien oftmals allgemein von „Polypen“ gesprochen oder zugrundeliegende histologische Klassifikationsschemata nicht weiter ausgeführt (GOUNARIS et al., 2007). Durch die dezidierte Klassifizierung muriner Läsionen mittels des toxikopathologischen INHAND Schemas (NOLTE et al., 2016), angelehnt an die humane WHO-Klassifikation, konnte dieses Defizit ausgeglichen werden.

Mit der Publikation II konnte gezeigt werden, dass in Kolonläsionen von Maus und Mensch die Anzahl der ieMMZ, abgebildet als Score 0 bis 5, im Verlauf der Progression von benignen Vorläuferläsionen zu malignen Karzinomen abnahm. Dieselbe Dynamik war in den ebenfalls untersuchten murinen Dünndarmläsionen nicht beobachtbar, was in Übereinstimmung mit früheren Studien für eine differierende Rolle der MZ im Rahmen der murinen Karzinogenese in Dün- und Dickdarm spricht (SAADALLA et al., 2018). In den 2 untersuchten felines Adenomen wurden immunhistochemisch keine ieMMZ detektiert.

Übereinstimmend mit Gounaris et al. (2007), die in ihrer Studie die MZ als essenziell für die Entwicklung präneoplastischer Läsionen identifizierten (GOUNARIS

et al., 2007), lassen die eigenen murinen Daten eine pro-tumorigene, die Karzinogenese bereits in frühem Stadium (Hyperplasie; low-grade Adenom) katalysierende Funktion, speziell der ieMMZ, vermuten. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass in der eigenen Untersuchung höhere murine ieMMZ-Scores mit einer vermehrten Tumorzellproliferation (% Ki-67⁺ Zellen) korrelierten. Obwohl bereits frühere Studien eine direkte MZ-Epithelzell-Interaktion, z.B. durch bestimmte Zytokine, vermuten lassen (GOUNARIS et al., 2007; SAADALLA et al., 2018), müssen die konkreten, funktionellen Wirkmechanismen der ieMMZ-Tumorzell-Interaktion in weiterführenden Studien erforscht werden. Die Frage nach der katalysierenden Wirkweise der ieMMZ im Rahmen der intestinalen Karzinogenese kann innerhalb dieser deskriptiven Studie nicht abschließend geklärt werden.

Die Dynamik der IpMMZ (Maus) bzw. intratumoraler stromaler MZ (Mensch und Katze) nahm im Verlauf der intestinalen Adenom-Karzinom-Sequenz tendenziell zu (Maus) bzw. ab (Mensch). Aufgrund der in limitierter Anzahl zur Verfügung stehenden Adenome, konnten diese Fragen hinsichtlich der feline Karzinogenese in Dünn- und Dickdarm nicht abschließend geklärt werden.

Diese subtypspezifische Dynamik von ieMMZ und IpMMZ/stromalen MZ im Verlauf der humanen und murinen Adenom-Karzinom-Progression spricht speziesübergreifend für eine verschiedenartige, evtl. sogar gegenläufige funktionelle Rolle der MZ-Subtypen im Rahmen der intestinalen Karzinogenese.

Bestätigend feststellen lässt sich, dass zur weiteren Erforschung funktioneller Aspekte und Wirkmechanismen der ieMMZ während der intestinalen Karzinogenese, eine stringente Klassifizierung der MMZ-Subpopulationen vonnöten ist (VOGEL et al., 2018). Diese kann, wie mit dieser Studie gezeigt wurde, zuverlässig nur mittels immunhistochemischer Methoden gelingen. Deutlich eosinophile, grob granuliert ieMMZ sind in der HE-Färbung nur im murinen Darm eindeutig erkennbar. Die Anwendung histochemischer Färbelösungen (z.B. Giemsa, Alcianblau) (ACIKALIN et al., 2005; ALVES et al., 2016) führt dazu, dass formalinsensitive MMZ-Subpopulationen in FFPE-Gewebe nicht identifiziert werden können. In zukünftigen, weiterführenden Studien hinsichtlich der Wirkmechanismen, aber auch der prognostischen Aussagekraft bestimmter MZ-Subtypen, ist daher eine zuverlässige Identifizierung mittels IHC-Marker (MCPT1 (murin) bzw. MZT (human)), sowie eine standardisierte und speziesvergleichbare Klassifikation von (prä-)neoplastischen Läsionen, unerlässlich. Die in der eigenen Studie vorgeschlagenen MZ-

Marker und das komparative MZ-Scoringsystem können hier als Ansatz dienen. Evaluationstechnisch könnten auch rein quantitative, computerassistierte Auszählalgorithmen zum Einsatz kommen. Eine standardisierte Vorgehensweise würde wahrscheinlich die bis dato kontroverse Datenlage zur prognostischen Aussagekraft der MZD (WU et al., 2013; MEHDAWI et al., 2016) im humanen KRK verbessern.

Eine weitere Erkenntnis der Studie war, dass murine, intratumorale ieMMZ-Scores zwischen verschiedenen GEMM der intestinalen Karzinogenese differieren. Am niedrigsten war die ieMMZ-Infiltration in komplexen (*Apc^{flox/flox}; Kras^{G12D/+}*-Hintergrund) sowie MAPK-alterierten GEMM, am höchsten in *Catnb^{Δex3}*-GEMM mit aktivierter Wnt/β-Catenin-Kaskade. Der mediane Score von AOM-DSS-induzierten Wildtyp-Tumoren lag mit einem Wert von 1 dazwischen. Die diesen deskriptiven Befunden zugrundeliegenden GEMM-spezifischen, molekularen Mechanismen können nur vermutet werden. Wichtig bleibt festzustellen, dass die modellspezifischen molekularen Mechanismen der intestinalen Karzinogenese einen Einfluss auf die Anzahl intratumoral infiltrierender ieMMZ zu haben scheinen. Studienergebnisse hinsichtlich der MZ-Infiltration bzw. MZD intestinaler Neoplasien könnten so nur eingeschränkt vergleichbar sein. Dementsprechend sollte das MZ-Vorkommen auch in humanen Studien immer in den Kontext individueller, molekularer Gegebenheiten gestellt werden.

MCPT1⁺ ieMMZ akkumulieren nachweislich nicht nur in parasitär infizierten Mäusen, sondern auch in vielen, regelmäßig genutzten GEMM zur Erforschung der intestinalen Karzinogenese. Weiterführende *in vivo* Studien in MZ-defizienten Mausmodellen sollten berücksichtigen, dass intestinale ieMMZ unter Umständen nicht depletiert werden (z.B. GEMM mit *Mcpt5*-Defizienz) (DUDECK et al., 2011). Die gezielte Manipulation der gesamten MZ-Population (FEYERABEND et al., 2011; HEGER et al., 2014; SASAKI et al., 2021) oder aber spezifischer MZ-Subpopulationen muss bei funktionellen Untersuchungen zur tumorigenen Wirkung der MZ-Subtypen im Darm sichergestellt werden. Durch gezielte MZ-Subtypmanipulation (z.B. GEMM mit *Mcpt1*-Defizienz) könnten in zukünftigen Studien die zugrundeliegenden funktionellen Mechanismen, mittels derer die ieMMZ das Auftreten und die Progression von intestinalen Adenomen zu Karzinomen beeinflussen, näher untersucht werden.

VI SCHLUSSBEMERKUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde eine immunhistochemische Beschreibung mukosaler Mastzellsubtypen im Verlauf der intestinalen Adenom-Karzinom-Progression vorgenommen. In der humanen Kolonkarzinomforschung bilden mausmodellbasierte Untersuchungen die am häufigsten angewandten *in vivo* Modelle und tragen somit einen wichtigen Teil zu neuen Forschungserkenntnissen bei. Die hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren dabei jedoch die Wichtigkeit der vergleichenden Pathologie. So können im Mausmodell erlangte Erkenntnisse auf diagnostischer oder therapeutischer Ebene nur eingeschränkt direkt translatiert werden.

Basierend auf dieser Arbeit wurde das spontane feline intestinale Karzinom als weiteres, vielversprechendes *in vivo* Modell für das humane Kolonkarzinom vorgestellt und charakterisiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass ieMMZ in intestinalen Karzinomen aller 3 Spezies identifizierbar sind. Im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese in Maus und Mensch nehmen ieMMZ ab, jedoch ist die ieMMZ-Proteasenausstattung der Spezies *Mus musculus* und *Homo sapiens* nicht identisch.

Diese deskriptive Annäherung an die Rolle der MMZ-Subtypen im Verlaufe der Adenom-Karzinom-Progression zeigt, dass es speziesübergreifend signifikante Unterschiede hinsichtlich der ieMMZ-Infiltration verschiedener intestinaler Tumorstadien gibt. Sie lässt noch offen, wie die funktionellen Mechanismen der Tumorzell-ieMMZ-Interaktion im Menschen und in spezifischen, genetisch modifizierten Mausmodellen aussehen.

Die vorgelegte Arbeit weist jedoch durch den angewandten, vergleichend-pathologischen Untersuchungsansatz auf phänotypische Unterschiede zwischen Mausmodell und Mensch hin. Sie bildet eine Basis für die zukünftig weiterführende Erforschung der tumorinfiltrierenden Mastzelle als prognostischer Biomarker (SAMMARCO et al., 2020) sowie von neuen, therapierelevanten Ansätzen zur Ergänzung von Chemotherapien, bspw. durch Tryptase- oder Tyrosinkinaseinhibitoren, bei Darmkrebs (MARECH et al., 2014) in Tier- und Humanmedizin.

VII ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle unterschiedlicher Mastzellsubtypen im Rahmen der intestinalen Karzinogenese

von Tanja Maria Groll

Mastzellen (MZ) sind Teil des intestinalen Tumormikromilieus. Sie beeinflussen nachweislich Wachstum, Progression, Angiogenese und Metastasierung kolorektaler Neoplasien. Aus diesem Grund stellen MZ potenzielle Ziele therapeutischer Intervention beim kolorektalen Karzinom dar.

Die bezüglich bestimmter Aspekte teils begrenzte Übertragbarkeit von *in vivo* Mausmodellen auf das fortgeschrittene humane Kolonkarzinom ist eine der hauptsächlichen Limitationen der Forschung. Genetisch modifizierte Mausmodelle (GEMM) sind nur bedingt nutzbar, da sich mit ihnen bestimmte humane, immunologische und invasive Tumorcharakteristika (z.B. Tumor Budding, Metastasierung) nur eingeschränkt modellieren lassen. In der veterinärmedizinischen Praxis werden Katzen mit spontanen intestinalen Karzinomen regelmäßig vorgestellt, feline Neoplasien wurden bislang jedoch nur unzureichend histologisch sowie molekularpathologisch charakterisiert.

Bis heute sind GEMM die am häufigsten angewandten Tiermodelle für das humane Kolonkarzinom. Von Vogel et al. (2018) wurden 2 Subtypen mukosaler Mastzellen (MMZ) im murinen Darm beschrieben: interepitheliale MMZ (ieMMZ) und Lamina propria-assoziierte MMZ (lpMMZ) (VOGEL et al., 2018). Unklar bleibt, ob identische MZ-Subtypen auch im humanen und felines Darm existieren. Weiterhin ist die Rolle dieser Subtypen im Rahmen der intestinalen Adenom-Karzinom-Sequenz in der Maus wenig, in Mensch und Katze bislang nicht, erforscht worden.

In dieser Doktorarbeit wurden intestinale Neoplasien der Spezies Katze, Maus und Mensch gemäß Konsensusrichtlinien histologisch klassifiziert und anschließend hinsichtlich ihrer MZ-Infiltration individuell und vergleichend analysiert.

In der ersten Studie wurde eine Kohorte aus 49 felines intestinalen Karzinomen histologisch aufgearbeitet und molekularpathologisch untersucht (Sanger-Sequenzierung des *CTNNB1*-Gens Exon 2). Aufgrund großer histomorphologischer Kongruenz, wurde die humane WHO-Klassifikation für Tumore des Kolons und Rektums (NAGTEGAAL et al., 2019) auch für die felines Neoplasien herangezogen.

In der zweiten Studie wurden MMZ in Adenomen und Karzinomen von Mäusen, Menschen und Katzen immunhistologisch charakterisiert (u.a. mittels MZ-Tryptase (muriner Mastzellprotease-6) bzw. MZ-Chymase (muriner Mastzellprotease-1)) und semiquantitativ, mittels entwickelter, speziesspezifischer Scores, ausgewertet. Die intratumorale Infiltration und Verteilung von MMZ wurde entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz evaluiert und statistisch interpretiert.

Feline intestinale Neoplasien bildeten den histologischen Phänotyp humaner kolorektaler Karzinome sehr gut ab. Die feline Tumore konnten in die humanen WHO-Subtypen eingeteilt werden und wiesen ein ähnlich aggressives Wachstumsverhalten auf wie humane *late-stage* Karzinome. Das nicht weiter spezifizierte Adenokarzinom (ANOS) war sowohl in der feline als auch in der humanen Kohorte der häufigste histologische Subtyp. Serratierte Adenokarzinome (SAC) waren in der feline Kohorte überrepräsentiert. Molekularpathologisch waren in 4 von 11 Fällen mit immunhistochemisch nachgewiesener, nukleärer β -Catenin Translokation Mutationen im feline *CTNBI*-Gen detektierbar, was eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges als zugrundeliegenden Pathomechanismus feline intestinaler Karzinome aufzeigte und somit eine weitere Parallele zur humanen kolorektalen Karzinogenese darstellte.

Interepitheliale MMZ konnten immunhistochemisch in intestinalen Neoplasien aller 3 Spezies detektiert werden. In den analysierten humanen und murinen Dickdarmläsionen waren die ieMMZ-Scores in Adenomen höher und nahmen im Laufe der Adenom-Karzinom-Sequenz ab. In murinen Dünndarmneoplasien konnte diese Dynamik nicht beobachtet werden. Murine lpMMZ nahmen von Hyperplasie zu Karzinom hin zu, während die Scores für humane stromale MZ am höchsten in high-grade Adenomen waren.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse erstens, dass spontane feline intestinale Karzinome ein vielversprechendes *in vivo* Modell für humane Kolonkarzinome darstellen. Zweitens, dass ieMMZ im Verlauf der humanen und murinen kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz in ihrer Häufigkeit kontinuierlich abnehmen, was für die stromale MZ-Subpopulation nicht zutrifft. Dies spricht für verschiedene funktionelle Rollen von ieMMZ und lpMMZ im Rahmen der intestinalen Karzinogenese. Schlussendlich bietet diese immunhistochemisch basierte, deskriptive Arbeit einen soliden Ausgangspunkt für zukünftige komparative Forschungsprojekte.

VIII SUMMARY

The role of different mast cell subtypes in the context of intestinal carcinogenesis

by Tanja Maria Groll

Mast cells (MCs) are immunologic players of the intestinal tumor microenvironment. They have been shown to influence growth, progression, angiogenesis and metastasis of colorectal tumors. Therefore, MCs represent a potential target for new therapeutic approaches in colorectal cancer (CRC) patients.

Partly limited transferability of appropriate *in vivo* models for late-stage human CRC is a major problem in CRC research, since genetically engineered mouse models (GEMMs) do not reflect spontaneous human CRC in terms of certain immunologic and invasive characteristics (e.g., tumor budding, metastasis). In feline patients, sporadic intestinal carcinomas are regularly diagnosed but have not been profoundly characterized yet.

To date, GEMMs are the most frequently employed animal models for human CRC. According to Vogel et al. (2018), 2 different mucosal mast cell (MMC) subtypes exist in the murine intestine: interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs) and lamina propria mucosal mast cells (lpMMCs) (VOGEL et al., 2018). It is uncertain whether there are identical MC subtypes in humans and other mammals, e.g., cats, as well. Furthermore, the role of these specific MC subtypes during intestinal adenoma-carcinoma progression remains to be elucidated.

In this doctoral project, intestinal tumors of cats, humans, and mice were histologically graded according to current consensus classification systems, then analyzed, and compared with respect to intratumoral MC infiltration.

In a first study, a cohort of 49 feline intestinal carcinomas was histologically characterized and investigated by performing Sanger Sequencing of feline *CTNNB1* exon 2. Due to high histomorphologic congruence, feline tumors were classified according to the current human WHO classification of Tumors of the Colon and Rectum (NAGTEGAAL et al., 2019).

In a second study, MMCs in adenomas and carcinomas of mice, humans, and cats, were characterized by using immunohistochemistry (IHC) (e.g., MC tryptase (murine mast cell protease 6), MC chymase (murine mast cell protease 1)) and semi-

quantitatively analyzed by developing and applying species-specific scoring systems. Intratumoral distribution of MMCs was evaluated along the adenoma-carcinoma sequence.

Feline intestinal neoplasia resembled the histological human CRC subtypes and displayed comparatively aggressive histological characteristics, similar to human late-stage carcinomas. Adenocarcinoma not otherwise specified (ANOS) was the most common subtype in both species. Serrated adenocarcinomas (SAC) were overrepresented in the feline cohort. Molecular investigation revealed mutational alterations of the feline *CTNNB1* gene in 4 of 11 cases with an immunohistochemically detectable, nuclear translocation of β -catenin, which illustrated the similarity of an impaired Wnt/ β -catenin signaling pathway in both, feline and human intestinal carcinomas.

Interepithelial MMCs were immunohistochemically detectable in neoplastic lesions of all 3 species. In human and murine colonic lesions, ieMMC scores were higher in adenomas and decreased along the adenoma-carcinoma progression. However, this dynamic was not visible in murine tumors of the small intestine. Murine lpMMCs increased from hyperplasia to carcinoma, whilst human stromal MC scores were highest in high-grade adenomas.

Collectively, these results show that first, feline spontaneous intestinal tumors constitute a promising *in vivo* model for human CRC. Second, ieMMCs decrease during human and murine adenoma-carcinoma progression of colonic neoplasia, whilst intestinal stromal MCs do not. These findings support the notion of different functional roles of ieMMCs and lpMMCs during intestinal carcinogenesis. Finally, this IHC-based, descriptive doctoral project provides a solid basis for future comparative research studies.

IX TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 	Ausgewählte granuläre Eigenschaften der Mastzellsubtypen der Maus. Modifiziert nach Schwartz (1994) und Welle (1997) (SCHWARTZ, 1994; WELLE, 1997).8
Tabelle 2 	Ausgewählte granuläre Eigenschaften der Mastzellsubtypen des Menschen. Modifiziert nach Irani & Schwartz (1994) und Welle (1997) (IRANI & SCHWARTZ, 1994; WELLE, 1997).8
Tabelle 3 	Übersicht verschiedener häufig angewandter Mausmodellsysteme in der pathoontologischen Forschung. Modifiziert nach Steiger (2020) (STEIGER, 2020).24

Tabelle A1	Verwendete Geräte.	119
Tabelle A2	Verwendete Software.....	120
Tabelle A3	Weitere verwendete Materialien.....	120
Tabelle A4	Reagenzien für histochemische Färbungen.	121
Tabelle A5	Primärantikörper für humanes, murines, felines FFPE-Gewebe.	121
Tabelle A6	Sekundärantikörper.....	124
Tabelle A7	Negativkontrollen.	124
Tabelle A8	Weitere Reagenzien für IHC.	125
Tabelle A9	Kommerzielle Kits.....	126
Tabelle A10	Reagenzien und Kits für DNA-Extraktion, Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sanger-Sequenzierung.....	127
Tabelle A11	Kohorten für Untersuchungen von MZ-Subpopulationen im Rahmen der intestinalen Karzinogenese.....	128
Tabelle A12	Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbeprotokoll.	129
Tabelle A13	Toluidinblaufärbeprotokoll modifiziert nach WebPath: Internet Pathology Laboratory (abgerufen am 24.06.2020) (WEBPATH), mit freundlicher Genehmigung durch Edward C. Klatt, Department of Biomedical Sciences, Savannah, GA, USA. ...	130
Tabelle A14	IHC-Protokoll Kaninchen-Primärantikörper („IHC Rab“).	131
Tabelle A15	IHC-Protokoll Kaninchen-Primärantikörper mit bovinem Serum Albumin (BSA) (1 %) Block („IHC RbBSA“).	132
Tabelle A16	IHC-Protokoll Ratten-Primärantikörper („IHC DABR“).	133
Tabelle A17	IHC-Protokoll Ziegen-Primärantikörper („IHC DABG“).	134
Tabelle A18	Sequenzielle Doppelfärbung („IHC RATD1 IHC RdRab“).	135
Tabelle A19	Sequenzielle Doppelfärbung („IHC MouD1 IHC MouD2“).	137
Tabelle A20	Ventana BenchMark XT Protokoll-Nr. 174 („Protease 4/16“) <i>ultraView</i> DAB v3.	139
Tabelle A21	Ventana BenchMark XT Protokoll-Nr. 338 („Ki-67 Dako“) <i>ultraView</i> DAB v3.	140
Tabelle A22	Ventana BenchMark XT Protokoll-Nr. 303 T („CeP CC1 mild“) <i>ultraView</i> DAB v3.	141
Tabelle A23	Ventana BenchMark XT Protokoll-Nr. 404 T („CC1 st. /20“) <i>ultraView</i> DAB v3.	142
Tabelle A24	Entwässerungsprotokoll.....	143
Tabelle A25	Zusammenfassung der diagnostischen Kriterien muriner intestinaler neoplastischer Läsionen modifiziert nach Washington et al. (2013) und Nolte et al. (2016) (WASHINGTON et al., 2013; NOLTE et al., 2016).	145

Tabelle A26	WHO-Grading humaner und feliner intestinaler Neoplasien modifiziert nach Nagtegaal et al. (2019) (NAGTEGAAL et al., 2019).	146
Tabelle A27	Histologische WHO-Subtypisierung humaner und feliner intestinaler Karzinome modifiziert nach Nagtegaal et al. (2019) (NAGTEGAAL et al., 2019).	146
Tabelle A28	Semiquantitatives Scoring der interepithelialen und Lamina propria-assoziierten mukosalen Mastzellinfiltration innerhalb (prä-)neoplastischer Areale im Darm der Maus.	147
Tabelle A29	Semiquantitatives Scoring der interepithelialen mukosalen Mastzellinfiltration innerhalb (prä-)neoplastischer Areale im Darm des Menschen und der Katze.	147
Tabelle A30	Semiquantitatives Scoring der intratumoralen stromalen Mastzellinfiltration innerhalb (prä-)neoplastischer Areale im Darm des Menschen und der Katze.	148
Tabelle A31	Temperaturprofil <i>CTNNB1</i> -PCR.	149
Tabelle A32	Protokoll (ExoSAP) zur Aufreinigung der PCR-Produkte.	149
Tabelle A33	Temperaturprofil BigDye TM Terminator Cycle Sequenzierungsreaktion.	150

X ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1 |** (A) Schematische und (B-D) korrespondierende histologische Darstellung intestinaler Mastzellsubtypen der Maus. *Proof of principle* des immunhistochemischen Algorithmus nach Vogel et al. (2018) (VOGEL et al., 2018). (B) In der Lamina (L.) epithelialis mucosae lokalisierte, runde interepitheliale mukosale Mastzellen (ieMMZ). Die epitheliale Lage oberhalb der Basalmembran wird mittels einer immunhistochemischen Doppelreaktion für Kollagen IV (Basallamina, rotes Chromogen, Pfeilspitzen) und Mastzellprotease-1 (MCPT1) (ieMMZ, braunes Chromogen, Pfeile) gezeigt. (C) In der Lamina propria mucosae lokalisierte, meist elongierte, mukosale Mastzellen (IpMMZ), dargestellt mittels Mastzellprotease-4 (MCPT4) Immunhistochemie (Pfeile). (D) In der Tela Submucosa und im darunterliegenden Bindegewebe lokalisierte, größere Bindegewebsmastzellen (BGMZ), positiv für MCPT4 (Pfeile). Schema (A) modifiziert nach Servier Medical Art, zur Verfügung gestellt durch Servier, lizenziert durch eine unportierte Creative Commons Attribution 3.0 Lizenz (SERVIER, o.J.) (abgerufen am 04.06.2020). 11
- Abbildung 2 |** Grafische Übersicht anti- und pro-tumorigener Mastzellfunktionen innerhalb des Tumormikromilieus (BISCHOFF, 2007; RIBATTI & CRIVELLATO, 2012; DE SOUZA et al., 2015; OLDFORD & MARSHALL, 2015; MUKAI et al., 2018; DUDECK et al., 2019; KOMI & REDEGELD, 2020). CCL: CC-Chemokin Ligand; CSF1: (Macrophage) Colony-Stimulating Factor 1; EZM: Extrazelluläre Matrix; FGF: Fibroblast Growth Factor; IL: Interleukin; INF: Interferon; LTB4/C4: Leukotrien B4/C4; MZ: Mastzelle; MMP: Matrix-Metalloprotease; NGF: Nerve Growth Factor; PAR-2: Protease-aktivierter Rezeptor 2; PDGF: Platelet-Derived Growth Factor; S1P: Sphingosin-1-Phosphat; SCF: Stem Cell Factor; TGF- β : Transforming Growth Factor beta; TMM: Tumormikromilieu; TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; VLA-4: Very Late Antigen-4 (Integrin $\alpha 4\beta 1$). Tumorzell- und Gefäßabbildungen von Servier Medical Art, zur Verfügung gestellt durch Servier, lizenziert durch eine unportierte Creative Commons Attribution 3.0 Lizenz (SERVIER, o.J.) (abgerufen am 11.04.2022). 16
- Abbildung 3 |** Schematischer Aufbau der intestinalen Darmwand. Schema modifiziert nach Gehart & Clevers (2019), mit freundlicher Genehmigung durch H. Clevers (GEHART & CLEVERS, 2019). 19
- Abbildung 4 |** (A-C) Mastzell-Tryptase (MZT)-Immunhistochemie (IHC) feliner intestinaler Karzinome. Feline ieMMZ sind MZT-positiv (Pfeile). (C) Demgegenüber stellen sich, gelegentlich im karzinomatösen Darmgewebe sichtbare, interepitheliale gelegene,

feline Globule Leukocytes (GLs) MZT-negativ dar (Kreise). (D) In der HE-Färbung färben sich die Granula feline GLs deutlich eosinophil an (Kreise), während ieMMZ nicht spezifisch darstellbar sind. (E) In der Toluidinblaufärbung stellen sich feline ieMMZ metachromatisch (violett) dar (Pfeile), GLs zeigen keine Metachromasie (Kreise). (F) In der Histamin-IHC sind feline ieMMZ positiv (Pfeile), feline GLs sind negativ (Kreis).73

Abbildung 5 | Mann-Whitney-U-Test für MZ-Scores feline intestinaler high-grade Adenome und Karzinome. (A) Mastzell-Tryptase positive (MZT⁺) ieMMZ-Infiltration ($p = 0.794$). (B) MZT⁺ stromale MZ-Infiltration ($p = 0.285$). *Extremer statistischer Ausreißer ($> 3 \cdot IQA$).74

Abbildung 6 | Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test für den Speziesvergleich der intratumoralen ieMMZ Scores (human und feline MZT⁺ bzw. murine MCPT1⁺). (A) Vergleich der ieMMZ-Scores der Gesamtheit evaluierter (Prä-)Neoplasien. In feline intestinalen (Prä-)Neoplasien (high- und low-grade Adenomen, Karzinomen) waren generell weniger intratumorale ieMMZ detektierbar als in den humanen und murinen. Murine Läsionen wiesen die stärkste neoplastische ieMMZ-Infiltration auf ($****p \leq 0.0001$). (B) Vergleich der Infiltration intestinaler Karzinome durch ieMMZ in den 3 Spezies. Mäuse wiesen dabei eine höhere, Menschen und Katzen im Vergleich dazu eine statistisch signifikant niedrigere ieMMZ-Infiltration auf ($***p \leq 0.001$). *Extreme statistische Ausreißer ($> 3 \cdot IQA$); ° milde statistische Ausreißer ($1,5-3 \cdot IQA$).75

- Abbildung A1** | Supplementary Figure S1. Tumor Budding (TB) in the invasive front of human CRC (HE; 20x). Tumor buds are indicated by arrow heads. (A) Low TB activity (Bd1); (B) Moderate TB activity (Bd2); (C) High TB activity (Bd3).152
- Abbildung A2** | Supplementary Figure S2. Corresponding human β -catenin phenotypes to Figure 2 (Anti- β -catenin; 20x). (A) Human colorectal tumor with no or scattered (< 5%) nuclear β -catenin staining; (B) 5-25% of tumor cells display nuclear positivity for β -catenin (score 1); (C) 26-50% of tumor cells display nuclear positivity (score 2); (D) > 50% of tumor cells are positive for nuclear β -catenin (score 3).....153
- Abbildung A3** | Grafische Übersicht (*Graphical Abstract*) der Publikation “*Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas*”....153
- Abbildung A4** | Auswahl der eigenen Publikation als Cover Story des Journals *Cancers*, Volume 13, Issue 23, Dezember (I) 2021.155
- Abbildung A5** | Figure S1: Overview of the human cohort ($n = 104$). Cohort I of 17 low-grade and 12 high-grade adenomas and 22 adenocarcinomas was extended by adenocarcinoma cohort II ($n = 53$). Grading of adenomas and carcinomas (low-grade; high-grade) was accomplished according to the current human WHO classification.156
- Abbildung A6** | Figure S2: A, B: Interepithelial mucosal mast cells (ieMMC)s in the intestinal mucosa of mice were not identifiable by metachromatic staining (toluidine blue). Serial sections for toluidine blue (A) and MCPT1 (B).....157
- Abbildung A7** | Figure S4: The employed semiquantitative score (0 to 5) for mucosal mast cells (ieMMCs and lpMMCs) in hotspots of murine intestinal lesions (hpf: high-power field, 40 \times).157
- Abbildung A8** | Figure S3: Grading of murine lesions was performed according to Nolte et al., 2016 (NOLTE et al., 2016). A–H: Murine lesions were graded as atypical hyperplasia (A, B); low-grade adenoma (C, D); high-grade adenoma (E, F); or invasive carcinoma (G, H).158
- Abbildung A9** | Figure S5: A–F: IeMMCs (A, B) were negative for histamine (C, D), while connective tissue mast cells (CTMCs) of the intestine were positive for histamine (E, F). A,C: Murine high-grade adenoma with MPCT1+ ieMMCs (arrowheads) (A), which were negative for histamine in the serial section (C). B, D: Human low-grade sessile serrated adenoma with MCT+ ieMMCs (arrowheads) (B), which were negative for histamine in the serial section (D). E, F: CTMCs in the intestine of mice (E) and humans (F) were positive for histamine (arrows).159
- Abbildung A10** | Figure S6: A: Murine connective tissue mast cells (CMTCs) were MCPT6⁺ (MC Tryptase⁺) and appeared densely granulated and round (arrowheads). B: Lamina proprial mucosal mast cells

- (lpMMCs, MCPT6⁺) of mice were generally slender and smaller than CTMCs (arrows).159
- Abbildung A11** | Figure S7: A–F: LpMMCs in the adenoma-carcinoma sequence of mouse (A, C, E) and intratumoral stromal MCs (ITSMCs) in the human adenoma-carcinoma sequence (B, D, F). G: Scores of lpMMCs were lower in murine hyperplastic precursor lesions than in adenomas and carcinomas (Kruskal–Wallis test, $p = 0.001$). H: Contradictorily, stromal MC scores were higher in human precursor lesions than in carcinomas (Kruskal–Wallis test, $p < 0.001$).160
- Abbildung A12** | Figure S8: A–C: Individual human stromal mast cells (ITSMCs) appeared to be nonspecifically positive due to heparin presence as previously described (SCHILTZ et al., 1993). MC tryptase-positive (MCT⁺) ieMMCs (arrows) (A) were negative in vesicular stomatitis virus (VSV)-IHC (B) and in mouse IgG isotype control (C), serving as negative IHC controls (serial sections). B, C: Connective tissue mast cells (CTMCs) (arrowheads) were occasionally positive in negative controls. Thus, MCT (A) was a specific marker for human intestinal ieMMCs.161
- Abbildung A13** | Figure S9: A–F: MCPT1⁺ ieMMCs (A–C) were not coincident with MMP9⁺ cells (D–F) in serial sections of murine intestine. G–L: Absence (G) or presence of MCPT1⁺ ieMMCs in murine intestinal neoplasia. J–L: Luminal intestinal crypt cells were more often positive for IL-5 than basal crypt cells (J–L), but IL-5 positivity did not clearly correlate with ieMMC density (arrowheads).162

XI QUELLENVERZEICHNIS

Acikalin MF, Oner U, Topçu I, Yaşar B, Kiper H, Colak E (2005). Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. *Dig Liver Dis*; 37(3): 162-169.

Adega F, Borges A, Chaves R (2016). Cat Mammary Tumors: Genetic Models for the Human Counterpart. *Vet Sci*; 3(3): 17.

Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM, Rodríguez-Urrutia A, Rodríguez-Lagunas MJ, Alonso-Cotoner C, Santos J, Vicario M (2019). Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells*; 8(2): 135.

Alves IS, Coser PH, Loureiro GJ, Nogueira da Gama LP, Ribeiro F, Bautz WG, Coburn KL, Pacheco M, da Gama de Souza LN (2016). Fibrosis and Mast Cells in Colorectal Lesions: Significance in Adenoma-Colorectal Cancer Sequence and Association with Diet. *J Gastrointest Cancer*; 47(3): 278-286.

Ammendola M, Patruno R, Sacco R, Marech I, Sammarco G, Zuccala V, Luposella M, Zizzo N, Gadaleta C, Porcelli M, Gadaleta CD, Ribatti D, Ranieri G (2016). Mast cells positive to tryptase and tumour-associated macrophages correlate with angiogenesis in locally advanced colorectal cancer patients undergone to surgery. *Expert Opin Ther Targets*; 20(5): 533-540.

Anfinsen KP, Berghoff N, Priestnall SL, Suchodolski JS, Steiner JM, Allenspach K (2014). Urinary and faecal N-methylhistamine concentrations do not serve as markers for mast cell activation or clinical disease activity in dogs with chronic enteropathies. *Acta Vet Scand*; 56: 90.

Aponte-López A, Muñoz-Cruz S (2020). Mast Cells in the Tumor Microenvironment. In: *Tumor Microenvironment*. Birbrair A, Hg. Cham: Springer International Publishing 2020: 159-173.

Arnold A, Tronser M, Sers C, Ahadova A, Endris V, Mamlouk S, Horst D, Möbs M, Bischoff P, Kloor M, Bläker H (2020). The majority of β -catenin mutations in colorectal cancer is homozygous. *BMC Cancer*; 20(1): 1038.

Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*; 66(4): 683-691.

Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*; 7(1): 16878.

Bennecke M, Kriegl L, Bajbouj M, Retzlaff K, Robine S, Jung A, Arkan MC, Kirchner T, Greten FR (2010). Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*; 18(2): 135-146.

Bergmann H, Roth S, Pechloff K, Kiss EA, Kuhn S, Heikenwälder M, Diefenbach A, Greten FR, Ruland J (2017). Card9-dependent IL-1 β regulates IL-22 production from group 3 innate lymphoid cells and promotes colitis-associated cancer. *Eur J Immunol*; 47(8): 1342-1353.

- Bischoff SC (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol*; 7(2): 93-104.
- Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, Ren S, Schwartz LB, Tonnesen MG, Gruber BL (1997). Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest*; 99(11): 2691-2700.
- Boeckxstaens G (2015). Mast cells and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Pharmacol*; 25: 45-49.
- Boivin GP, Washington K, Yang K, Ward JM, Pretlow TP, Russell R, Besselsen DG, Godfrey VL, Doetschman T, Dove WF, Pitot HC, Halberg RB, Itzkowitz SH, Groden J, Coffey RJ (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology*; 124(3): 762-777.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*; 58(22): 5248-5257.
- Bueno L, Fioramonti J (2008). Protease-activated receptor 2 and gut permeability: a review. *Neurogastroenterol Motil*; 20(6): 580-587.
- Cannon CM (2015). Cats, Cancer and Comparative Oncology. *Vet Sci*; 2(3): 111-126.
- Chan TL, Zhao W, Leung SY, Yuen ST (2003). BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res*; 63(16): 4878-4881.
- Cheon DJ, Orsulic S (2011). Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol*; 6: 95-119.
- Cheung AF, Carter AM, Kostova KK, Woodruff JF, Crowley D, Bronson RT, Haigis KM, Jacks T (2010). Complete deletion of Apc results in severe polyposis in mice. *Oncogene*; 29(12): 1857-1864.
- Compton SJ, Renaux B, Wijesuriya SJ, Hollenberg MD (2001). Glycosylation and the activation of proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) by human mast cell tryptase. *Br J Pharmacol*; 134(4): 705-718.
- Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D (1999). Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*; 13(11): 1382-1397.
- Czajkowski PS, Parry NM, Wood CA, Casale SA, Phipps WE, Mahoney JA, Spector DI, Price LL, Berg J (2022). Outcome and Prognostic Factors in Cats Undergoing Resection of Intestinal Adenocarcinomas: 58 Cases (2008-2020). *Front Vet Sci*; 9: 911666.
- da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*; 62(10): 698-738.
- De Robertis M, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetelli L, Signori E, Fazio VM (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*; 10: 9.
- de Souza DA, Jr, Toso VD, Campos MR, Lara VS, Oliver C, Jamur MC (2012). Expression of mast cell proteases correlates with mast cell maturation and angiogenesis during tumor

progression. PLoS One; 7(7): e40790.

de Souza DA, Jr, Santana AC, da Silva EZ, Oliver C, Jamur MC (2015). The Role of Mast Cell Specific Chymases and Trypsases in Tumor Angiogenesis. *Biomed Res Int*; 2015: 142359.

Dudeck A, Dudeck J, Scholten J, Petzold A, Surianarayanan S, Köhler A, Peschke K, Vöhringer D, Waskow C, Krieg T, Müller W, Waisman A, Hartmann K, Gunzer M, Roers A (2011). Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity*; 34(6): 973-984.

Dudeck A, Köberle M, Goldmann O, Meyer N, Dudeck J, Lemmens S, Rohde M, Roldán NG, Dietze-Schwonberg K, Orinska Z, Medina E, Hendrix S, Metz M, Zenclussen AC, von Stebut E, Biedermann T (2019). Mast cells as protectors of health. *J Allergy Clin Immunol*; 144(4): 4-18.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*; 3(11): 991-998.

Ehrlich P (1878) Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. I. Teil: Die chemische Auffassung der Färbung. II. Teil: Die Anilinfarben in chemischer, technologischer und histologischer Beziehung. Diss. med. Universität Leipzig, Leipzig. 1-65.

Enerbäck L (1966a). Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 1. Effects of fixation. *Acta path. et microbiol. scandinav.*; 66(3): 289-302.

Enerbäck L (1966b). Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta path. et microbiol. scandinav.*; 66(3): 303-312.

Enerbäck L (1986). Mast cell heterogeneity: the evolution of the concept of a specific mucosal mast cell. In: Mast cell differentiation and heterogeneity. Befus A, Bienenstock J und Denburg J, Hgg. New York: Raven Press 1986: 1-26.

Esteves MI, Schrenzel MD, Marini RP, Taylor NS, Xu S, Hagen S, Feng Y, Shen Z, Fox JG (2000). *Helicobacter pylori* gastritis in cats with long-term natural infection as a model of human disease. *Am J Pathol*; 156(2): 709-721.

Fang KC, Raymond WW, Lazarus SC, Caughey GH (1996). Dog mastocytoma cells secrete a 92-kD gelatinase activated extracellularly by mast cell chymase. *J Clin Invest*; 97(7): 1589-1596.

Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*; 61(5): 759-767.

Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, Radermacher P, Möller P, Benoist C, Mathis D, Fehling HJ, Rodewald HR (2011). Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity*; 35(5): 832-844.

Flores de Los Rios PA, Soto Domínguez A, Arellano-Pérez Vertti RD, Castelán Maldonado EE, Velázquez Gauna SE, Morán Martínez J, Salas Treviño D, García Garza R (2020). Differential expression of mast cell granules in samples of metastatic and non-metastatic colorectal cancer in patients. *Acta Histochem*; 122(7): 151618.

Friend DS, Ghildyal N, Austen KF, Gurish MF, Matsumoto R, Stevens RL (1996). Mast

cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *J Cell Biol*; 135(1): 279-290.

Frossi B, Mion F, Sibilano R, Danelli L, Pucillo CEM (2018). Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev*; 282(1): 35-46.

Frossi B, De Carli M, Calabro A (2019). Coeliac Disease and Mast Cells. *Int J Mol Sci*; 20(14): 3400.

Galdiero MR, Varricchi G, Seaf M, Marone G, Levi-Schaffer F, Marone G (2017). Bidirectional Mast Cell-Eosinophil Interactions in Inflammatory Disorders and Cancer. *Front Med*; 4: 103.

Gehart H, Clevers H (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 16(1): 19-34.

Georges LMC, De Wever O, Galván JA, Dawson H, Lugli A, Demetter P, Zlobec I (2019). Cell Line Derived Xenograft Mouse Models Are a Suitable *in vivo* Model for Studying Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front Med*; 6: 139.

Gordon MD, Nusse R (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*; 281(32): 22429-22433.

Gounaris E, Erdman SE, Restaino C, Gurish MF, Friend DS, Gounari F, Lee DM, Zhang G, Glickman JN, Shin K, Rao VP, Poutahidis T, Weissleder R, McNagny KM, Khazaie K (2007). Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104(50): 19977-19982.

Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, Ben-Izhak O, Cohen HI, Trougouboff P, Bejhar J, Sova Y, Pinchev M, Rennert G, Gruber SB (2009). Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*; 33(1): 126-133.

Grützkau A, Krüger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwarz C, Kögel H, Welker P, Lippert U, Henz BM, Möller A (1998). Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell*; 9(4): 875-884.

Gulubova M, Vlaykova T (2009). Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*; 24(7): 1265-1275.

Gurish MF, Austen KF (2012). Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*; 37(1): 25-33.

Hall G, Clarkson A, Shi A, Langford E, Leung H, Eckstein RP, Gill AJ (2010). Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma. *Pathology*; 42(5): 409-413.

Hammer AS, Kessler M (2005). Tumoren des Kolons und Rektums. In: *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze*, 2. Aufl. Kessler M, Hg. Berlin: Parey 2005: 290-293.

- Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M, Taketo MM (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *Embo j*; 18(21): 5931-5942.
- Hardy WB, Wesbrook FF (1895). The Wandering Cells of the Alimentary Canal. *J Physiol*; 18(5-6): 490-524.
- Harley R, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ (2002). Non-specific labelling of mast cells in feline oral mucosa - a potential problem in immunohistochemical studies. *J Comp Pathol*; 127(2-3): 228-231.
- He S, Walls AF (1998). Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. *Br J Pharmacol*; 125(7): 1491-1500.
- Head K, Cullen J, Dubielzig R, Else R, Midsrop W, Patnaik A, Tateyama S, van der Gaag I (2003). Histological Classification of Tumors of the Intestines of Domestic Animals. In: WHO Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals, 2. Aufl. Head K, Hg. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology 2003: 87-110.
- Heger K, Seidler B, Vahl JC, Schwartz C, Kober M, Klein S, Voehringer D, Saur D, Schmidt-Supprian M (2014). CreER(T2) expression from within the c-Kit gene locus allows efficient inducible gene targeting in and ablation of mast cells. *Eur J Immunol*; 44(1): 296-306.
- Herbst A, Jurinovic V, Krebs S, Thieme SE, Blum H, Göke B, Kolligs FT (2014). Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling. *BMC Genomics*; 15: 74.
- Hodges K, Kennedy L, Meng F, Alpini G, Francis H (2012). Mast cells, disease and gastrointestinal cancer: A comprehensive review of recent findings. *Transl Gastrointest Cancer*; 1(2): 138-150.
- Holcombe RF, Marsh JL, Waterman ML, Lin F, Milovanovic T, Truong T (2002). Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Mol Pathol*; 55(4): 220-226.
- Holmgren H, Wilander O (1937). Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlichschen Mastzellen. *Ztscher Mikr-Anat Forsch*; 42: 242-278.
- Honor DJ, De Nicola DB, Turek JJ, Render JA, Serra DA (1986). A neoplasm of globule leukocytes in a cat. *Vet Pathol*; 23(3): 287-292.
- Horiuchi T, Weller PF (1997). Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 17(1): 70-77.
- Huang B, Lei Z, Zhang GM, Li D, Song C, Li B, Liu Y, Yuan Y, Unkeless J, Xiong H, Feng ZH (2008). SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood*; 112(4): 1269-1279.
- Hui L, Chen Y (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett*; 368(1): 7-13.
- Huntley JF (1992). Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function.

J Comp Pathol; 107(4): 349-372.

Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. Proc Natl Acad Sci U S A; 83(12): 4464-4468.

Irani AM, Schwartz LB (1994). Human mast cell heterogeneity. Allergy Proc; 15(6): 303-308.

Jackstadt R, Sansom OJ (2016). Mouse models of intestinal cancer. J Pathol; 238(2): 141-151.

Jesinghaus M, Schmitt M, Lang C, Reiser M, Scheiter A, Konukiewitz B, Steiger K, Silva M, Tschurtschenthaler M, Lange S, Foersch S, Becker KF, Saur D, Friess H, Halfter K, Engel J, Boxberg M, Pfarr N, Wilhelm D, Weichert W (2021). Morphology Matters: A Critical Reappraisal of the Clinical Relevance of Morphologic Criteria From the 2019 WHO Classification in a Large Colorectal Cancer Cohort Comprising 1004 Cases. Am J Surg Pathol; 45(7): 969-978.

Jiang Y, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, Cheng H, Ajani JA (2009). Assessment of K-ras mutation: a step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. Cancer; 115(16): 3609-3617.

Jiang Y, Wu Y, Hardie WJ, Zhou X (2017). Mast cell chymase affects the proliferation and metastasis of lung carcinoma cells in vitro. Oncol Lett; 14(3): 3193-3198.

Jikuhara A, Yoshii M, Iwagaki H, Mori S, Nishibori M, Tanaka N (2003). MAP kinase-mediated proliferation of DLD-1 carcinoma by the stimulation of protease-activated receptor 2. Life Sci; 73(22): 2817-2829.

Kalesnikoff J, Galli SJ (2008). New developments in mast cell biology. Nature Immunology; 9: 1215-1223.

Karim BO, Huso DL (2013). Mouse models for colorectal cancer. Am J Cancer Res; 3(3): 240-250.

Kent JF (1952). The origin, fate, and cytochemistry of the globule leucocyte of the sheep. Anat Rec; 112(1): 91-115.

Kent JF (1966). Distribution and fine structure of globule leucocytes in respiratory and digestive tracts of the laboratory rat. Anat Rec; 156(4): 439-453.

Keum N, Giovannucci E (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Nat Rev Gastroenterol Hepatol; 16(12): 713-732.

Komi DEA, Redegeld FA (2020). Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. Clin Rev Allergy Immunol; 58: 313-325.

Koveitpour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Seyed Forootan F, Nasr Esfahani MH, Ghaedi K (2019). Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. Cell Biosci; 9: 97.

Kube P, Audige L, Kuther K, Welle M (1998). Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. Histochem Cell Biol; 110(2): 129-135.

- Lane DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*; 358(6381): 15-16.
- LeBlanc AK, Breen M, Choyke P, Dewhirst M, Fan TM, Gustafson DL, Helman LJ, Kastan MB, Knapp DW, Levin WJ, London C, Mason N, Mazcko C, Olson PN, Page R, Teicher BA, Thamm DH, Trent JM, Vail DM, Khanna C (2016). Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's Workshop on Comparative Oncology. *Sci Transl Med*; 8(324): 324ps325.
- LeBlanc AK, Mazcko CN (2020). Improving human cancer therapy through the evaluation of pet dogs. *Nat Rev Cancer*; 20(12): 727-742.
- Leo VI, Tan SH, Bergmann H, Cheah PY, Chew MH, Lim KH, Ruland J, Reilly PT (2015). CARD9 Promotes Sex-Biased Colon Tumors in the APCmin Mouse Model. *Cancer Immunol Res*; 3(7): 721-726.
- Li S, Guan J, Ge M, Huang P, Lin Y, Gan X (2015). Intestinal mucosal injury induced by tryptase-activated protease-activated receptor 2 requires β -arrestin-2 in vitro. *Mol Med Rep*; 12(5): 7181-7187.
- Malfettone A, Silvestris N, Saponaro C, Ranieri G, Russo A, Caruso S, Popescu O, Simone G, Paradiso A, Mangia A (2013). High density of tryptase-positive mast cells in human colorectal cancer: a poor prognostic factor related to protease-activated receptor 2 expression. *J Cell Mol Med*; 17(8): 1025-1037.
- Mao Y, Feng Q, Zheng P, Yang L, Zhu D, Chang W, Ji M, He G, Xu J (2018). Low tumor infiltrating mast cell density confers prognostic benefit and reflects immunoactivation in colorectal cancer. *Int J Cancer*; 143(9): 2271-2280.
- Marech I, Ammendola M, Gadaleta C, Zizzo N, Oakley C, Gadaleta CD, Ranieri G (2014). Possible biological and translational significance of mast cells density in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*; 20(27): 8910-8920.
- Marichal T, Tsai M, Galli SJ (2013). Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunol Res*; 1(5): 269-279.
- Mauro LV, Bellido M, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, Pallotta MG, Lastiri J, Puricelli LI, De Cidre LL (2008). Association between mast cells of different phenotypes and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol Med Rep*; 1(6): 895-902.
- McIntyre RE, Buczacki SJ, Arends MJ, Adams DJ (2015). Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. *Bioessays*; 37(8): 909-920.
- Mehdawi L, Osman J, Topi G, Sjolander A (2016). High tumor mast cell density is associated with longer survival of colon cancer patients. *Acta Oncol*; 55(12): 1434-1442.
- Menzies-Gow A, Ying S, Phipps S, Kay AB (2004). Interactions between eotaxin, histamine and mast cells in early microvascular events associated with eosinophil recruitment to the site of allergic skin reactions in humans. *Clin Exp Allergy*; 34(8): 1276-1282.
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA (1997). Mast cells. *Physiol Rev*; 77(4): 1033-1079.
- Meuten DJ, Moore FM, Donovan TA, Bertram CA, Klopfleisch R, Foster RA, Smedley RC, Dark MJ, Milovancev M, Stromberg P, Williams BH, Aubreville M, Avallone G, Bolfa P, Cullen J, Dennis MM, Goldschmidt M, Luong R, Miller AD, Miller MA, Munday JS, Roccabianca P, Salas EN, Schulman FY, Laufer-Amorim R, Asakawa MG, Craig L,

- Dervisis N, Esplin DG, George JW, Hauck M, Kagawa Y, Kiupel M, Linder K, Meichner K, Marconato L, Oblak ML, Santos RL, Simpson RM, Tvedten H, Whitley D (2021). International Guidelines for Veterinary Tumor Pathology: A Call to Action. *Vet Pathol*; 58(5): 766-794.
- Morson BC (1962). Precancerous lesions of the colon and rectum. Classification and controversial issues. *Jama*; 179: 316-321.
- Moser AR, Pitot HC, Dove WF (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*; 247(4940): 322-324.
- Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ (2018). Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev*; 282(1): 121-150.
- Mulloy B, Lever R, Page CP (2017). Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconj J*; 34(3): 351-361.
- Munday JS, Löhr C.V., Kiupel M. (2017). Tumors of the alimentary tract. In: *Tumors of domestic animals*, 5. Aufl. Meuten DJ, Hg. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc. 2017: 499-601.
- Nagtegaal I, Arends M, Odze R, Pai R, Mäkinen M, Rosty C, Hamilton S, Sekine S, Salto-Tellez M (2019). Digestive System Tumours: Tumours of the Colon and Rectum. In: *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System*, 5. Aufl. Nagtegaal I, MJ A, Odze R und Lam A, Hgg. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press 2019: 157-187.
- Network TCGA (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*; 487(7407): 330-337.
- Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, Hailey R, Leach MW, Pandiri AR, Rogers A, Shackelford CC, Spencer A, Tanaka T, Ward JM (2016). Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse. *Journal of Toxicologic Pathology*; 29(1 Suppl): 1S-125S.
- Noviana D, Kono F, Nagakui Y, Shimizu H, Mamba K, Makimura S, Horii Y (2001). Distribution and enzyme histochemical characterisation of mast cells in cats. *Histochem J*; 33(11-12): 597-603.
- Ohfuji S (2020). Retrospective analysis of globule leukocytes in parasite-free rumens of cattle: a histopathological research with literature review. *Comparative Clinical Pathology*; 29(3): 645-651.
- Oldford SA, Marshall JS (2015). Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors. *Mol Immunol*; 63(1): 113-124.
- Olin FH, Lea RB, Kim C (1968). Colonic adenoma in a cat. *J Am Vet Med Assoc*; 153(1): 53-56.
- Parang B, Barrett CW, Williams CS (2016). AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. In: *Gastrointestinal Physiology and Diseases. Methods in Molecular Biology*, Vol 1422. Ivanov AI, Hg. New York: Humana Press 2016: 297-307.
- Patnaik AK, Liu SK, Johnson GF (1976). Feline intestinal adenocarcinoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Vet Pathol*; 13(1): 1-10.

- Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S (2007). Mast cell proteases. In: *Advances in immunology*. Alt F, Hg. Amsterdam: Elsevier Inc. 2007: 167-255.
- Pejler G, Rönnberg E, Waern I, Wernersson S (2010). Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*; 115(24): 4981-4990.
- Presta I, Donato A, Zaffino P, Spadea MF, Mancuso T, Malara N, Chiefari E, Donato G (2019). Does a polarization state exist for mast cells in cancer? *Med Hypotheses*; 131: 109281.
- Rad R, Cadinanos J, Rad L, Varela I, Strong A, Kriegl L, Constantino-Casas F, Eser S, Hieber M, Seidler B, Price S, Fraga MF, Calvanese V, Hoffman G, Ponstingl H, Schneider G, Yusa K, Grove C, Schmid RM, Wang W, Vassiliou G, Kirchner T, McDermott U, Liu P, Saur D, Bradley A (2013). A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell*; 24(1): 15-29.
- Ramos-Vara JA, Miller MA (2014). When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry - the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol*; 51(1): 42-87.
- Ribatti D, Roncali L, Nico B, Bertossi M (1987). Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane. *Acta Anat (Basel)*; 130(3): 257-263.
- Ribatti D, Crivellato E (2012). Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim Biophys Acta*; 1822(1): 2-8.
- Ribatti D (2016). Mast cells as therapeutic target in cancer. *Eur J Pharmacol*; 778: 152-157.
- Ribatti D (2018). The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. *Int Arch Allergy Immunol*; 176(1): 55-60.
- Rissetto K, Villamil JA, Selting KA, Tyler J, Henry CJ (2011). Recent trends in feline intestinal neoplasia: an epidemiologic study of 1,129 cases in the veterinary medical database from 1964 to 2004. *J Am Anim Hosp Assoc*; 47(1): 28-36.
- Rönnberg E, Melo FR, Pejler G (2012). Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem*; 60(12): 950-962.
- Ruck P, Horny HP, Kaiserling E (1990). Immunoreactivity of human tissue mast cells: nonspecific binding of primary antibodies against regulatory peptides by ionic linkage. *J Histochem Cytochem*; 38(6): 859-867.
- Rustgi AK (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*; 21(20): 2525-2538.
- Saadalla AM, Osman A, Gurish MF, Dennis KL, Blatner NR, Pezeshki A, McNagny KM, Cheroutre H, Gounari F, Khazaie K (2018). Mast cells promote small bowel cancer in a tumor stage-specific and cytokine-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 115(7): 1588-1592.
- Sammarco G, Gallo G, Vescio G, Picciariello A, De Paola G, Trompetto M, Currò G, Ammendola M (2020). Mast Cells, microRNAs and Others: The Role of Translational Research on Colorectal Cancer in the Forthcoming Era of Precision Medicine. *J Clin Med*; 9(9): 2852.
- Sasaki H, Imanishi M, Fujikura D, Sugiyama M, Tanimoto K, Mochiji Y, Takahashi Y,

- Hiura K, Watanabe M, Kashimoto T, Nakano K, Okamura T, Sasaki N (2021). New inducible mast cell-deficient mouse model (Mcpt5/Cma1(DTR)). *Biochem Biophys Res Commun*; 551: 127-132.
- Schiltz PM, Lieber J, Giorno RC, Claman HN (1993). Mast cell immunohistochemistry: non-immunological immunostaining mediated by non-specific F(ab')₂-mast cell secretory granule interaction. *Histochem J*; 25(9): 642-647.
- Schneider G, Schmidt-Supprian M, Rad R, Saur D (2017). Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nat Rev Cancer*; 17(4): 239-253.
- Schwartz LB (1994). Mast cells: function and contents. *Curr Opin Immunol*; 6(1): 91-97.
- Schwartz LB (2001). Clinical utility of tryptase levels in systemic mastocytosis and associated hematologic disorders. *Leuk Res*; 25(7): 553-562.
- Schwittlick U, Becker S, Aupperle-Lellbach H (2020). Vorkommen und Lokalisation von gastrointestinalen Neoplasien bei 293 Katzen. *Kleintiermedizin*; 6: 250-253.
- Scudamore CL, McMillan L, Thornton EM, Wright SH, Newlands GF, Miller HR (1997). Mast cell heterogeneity in the gastrointestinal tract: variable expression of mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) in intraepithelial mucosal mast cells in nematode-infected and normal BALB/c mice. *Am J Pathol*; 150(5): 1661-1672.
- Segura-Villalobos D, Ramírez-Moreno IG, Martínez-Aguilar M, Ibarra-Sánchez A, Muñoz-Bello JO, Anaya-Rubio I, Padilla A, Macías-Silva M, Lizano M, González-Espinosa C (2022). Mast Cell-Tumor Interactions: Molecular Mechanisms of Recruitment, Intratumoral Communication and Potential Therapeutic Targets for Tumor Growth. *Cells*; 11(3): 349.
- Senda T, Shimomura A, Iizuka-Kogo A (2005). Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int*; 80(3): 121-131.
- Servier (o.J.) Servier Medical Art. <https://smart.servier.com/> (abgerufen am 04.06.2020 und 11.04.2022).
- Simson L, Ellyard JI, Dent LA, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS, Smyth MJ, Parish CR (2007). Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol*; 178(7): 4222-4229.
- Sinowatz F, Hees H, Rodler D (2012). Allgemeiner Bauplan des Rumpfdarmes. In: *Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, 5. Aufl. Sinowatz F, Hg.: Sinowatz, F 2012: 267-269.
- Slawienski MJ, Mauldin GE, Mauldin GN, Patnaik AK (1997). Malignant colonic neoplasia in cats: 46 cases (1990-1996). *J Am Vet Med Assoc*; 211(7): 878-881.
- Sörbo J, Jakobsson A, Norrby K (1994). Mast-cell histamine is angiogenic through receptors for histamine₁ and histamine₂. *Int J Exp Pathol*; 75(1): 43-50.
- Stefanius K, Ylitalo L, Tuomisto A, Kuivila R, Kantola T, Sirmö P, Karttunen TJ, Mäkinen MJ (2011). Frequent mutations of KRAS in addition to BRAF in colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*; 58(5): 679-692.
- Steiger K (2020) Möglichkeiten und Grenzen von Tiermodellen in der onkologischen Forschung aus Sicht der vergleichenden Pathologie. Habilitationsschrift. Technische

Universität München, München. 1-65.

Strobel S, Miller HR, Ferguson A (1981). Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. *J Clin Pathol*; 34(8): 851-858.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*; 71(3): 209-249.

Takeuchi A, Jervis HR, Sprinz H (1969). The globule leucocyte in the intestinal mucosa of the cat: a histochemical, light and electron microscopic study. *Anat Rec*; 164(1): 79-99.

Tan SY, Fan Y, Luo HS, Shen ZX, Guo Y, Zhao LJ (2005). Prognostic significance of cell infiltrations of immunosurveillance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*; 11(8): 1210-1214.

Toner PG, Ferguson A (1971). Intraepithelial cells in the human intestinal mucosa. *J Ultrastruct Res*; 34(3): 329-344.

Turk MA, Gallina AM, Russell TS (1981). Nonhematopoietic gastrointestinal neoplasia in cats: a retrospective study of 44 cases. *Vet Pathol*; 18(5): 614-620.

Uneyama M, Chambers JK, Nakashima K, Uchida K (2021a). Feline pyloric and duodenal adenoma: A histological and immunohistochemical study. *Vet Pathol*; 58(6): 1025–1032.

Uneyama M, Chambers JK, Nakashima K, Uchida K, Nakayama H (2021b). Histological Classification and Immunohistochemical Study of Feline Colorectal Epithelial Tumors. *Vet Pathol*; 58(2): 305-314.

Uvnäs B, Aborg CH, Bergendorff A (1970). Storage of histamine in mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to protein carboxyls in the granule heparin-protein complex. *Acta Physiol Scand Suppl*; 336: 1-26.

Van Meulder F, Van Coppennolle S, Borloo J, Rinaldi M, Li RW, Chiers K, Van den Broeck W, Vercruyse J, Claerebout E, Geldhof P (2013). Granule exocytosis of granulysin and granzyme B as a potential key mechanism in vaccine-induced immunity in cattle against the nematode *Ostertagia ostertagi*. *Infect Immun*; 81(5): 1798-1809.

Vogel P, Janke L, Gravano DM, Lu M, Sawant DV, Bush D, Shuyu E, Vignali DAA, Pillai A, Rehgle JE (2018). Globule Leukocytes and Other Mast Cells in the Mouse Intestine. *Vet Pathol*; 55(1): 76-97.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*; 319(9): 525-532.

Wang S, Li L, Shi R, Liu X, Zhang J, Zou Z, Hao Z, Tao A (2016). Mast Cell Targeted Chimeric Toxin Can Be Developed as an Adjunctive Therapy in Colon Cancer Treatment. *Toxins (Basel)*; 8(3): 71.

Ward JM, Treuting PM, Washington MK (2022). The Gastrointestinal Tract. In: *Pathology of Genetically Engineered and Other Mutant Mice*, 1. Aufl. Sundberg JP, Vogel P und Ward JM, Hgg. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc. 2022: 259-283.

Washington MK, Powell AE, Sullivan R, Sundberg JP, Wright N, Coffey RJ, Dove WF (2013). Pathology of rodent models of intestinal cancer: progress report and

recommendations. *Gastroenterology*; 144(4): 705-717.

WebPath (1994-2022) Mast Cells - Toluidine Blue. The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. Staining Manual - Special Cells and Tissues: <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/TOLUID.PDF> (abgerufen am 24.06.2020).

Weidner N, Austen KF (1993). Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract*; 189(2): 156-162.

Weill P (1919). Ueber die leukocytären Elemente der Darmschleimhaut der Säugetiere. Ein Beitrag zur Beurteilung der Granulationen in Leukocyten. *Archiv f. mikr. Anat.*; 93(1): 1-81.

Welle M (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol*; 61(3): 233-245.

Westphal E (1891). Über Mastzellen. In: *Farbenanalytische Untersuchungen*. Ehrlich P, Hg. Hirschwald, Berlin: 1891: 17-41.

Willard MD (2010). Neoplasien des Dickdarms. In: *Innere Medizin der Kleintiere*, 2. deutsche Aufl. Nelson RW und Couto CG, Hgg. München: Elsevier, Urban&Fischer Verlag 2010: 491-492.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*; 318(5853): 1108-1113.

Wu X, Zou Y, He X, Yuan R, Chen Y, Lan N, Lian L, Wang F, Fan X, Zeng Y, Ke J, Wu X, Lan P (2013). Tumor-infiltrating mast cells in colorectal cancer as a poor prognostic factor. *Int J Surg Pathol*; 21(2): 111-120.

Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, Hechtman JF, Cercek A, Sanchez-Vega F, Jayakumaran G, Middha S, Zehir A, Donoghue MTA, You D, Viale A, Kemeny N, Segal NH, Stadler ZK, Varghese AM, Kundra R, Gao J, Syed A, Hyman DM, Vakiani E, Rosen N, Taylor BS, Ladanyi M, Berger MF, Solit DB, Shia J, Saltz L, Schultz N (2018). Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell*; 33(1): 125-136.

Yamaguchi T, Nishijima M, Tashiro K, Kawabata K (2016). Wnt- β -Catenin Signaling Promotes the Maturation of Mast Cells. *Biomed Res Int*; 2016: 2048987.

Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP (2014). Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*; 20(10): 2634-2640.

Yoshii M, Jikuhara A, Mori S, Iwagaki H, Takahashi HK, Nishibori M, Tanaka N (2005). Mast cell tryptase stimulates DLD-1 carcinoma through prostaglandin- and MAP kinase-dependent manners. *J Pharmacol Sci*; 98(4): 450-458.

Yu Y, Blokhuis B, Derks Y, Kumari S, Garssen J, Redegeld F (2018). Human mast cells

promote colon cancer growth via bidirectional crosstalk: studies in 2D and 3D coculture models. *Oncoimmunology*; 7(11): e1504729.

Yu Y, Blokhuis BR, Garssen J, Redegeld FA (2019). A Transcriptomic Insight into the Impact of Colon Cancer Cells on Mast Cells. *Int J Mol Sci*; 20(7): 1689.

XII PUBLIKATIONEN UND BEITRÄGE AUF WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNGEN

1 Publikationen in Fachzeitschriften mit Peer-Review-Verfahren

1. **Groll T**, Silva M, Sarker RSJ, Tschurtschenthaler M, Schnalzger T, Mogler C, Denk D, Schölch S, Schraml BU, Ruland J, Rad R, Saur D, Weichert W, Jesinghaus M, Matiasek K, Steiger K. Comparative Study of the Role of Interepithelial Mucosal Mast Cells in the Context of Intestinal Adenoma-Carcinoma Progression. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 30;14(9):2248. <https://doi.org/10.3390/cancers14092248>. PMID: 35565377; PMCID: PMC9105816.
2. **Groll T**, Schopf F, Denk D, Mogler C, Schwittlick U, Aupperle-Lellbach H, Sarker SRJ, Pfarr N, Weichert W, Matiasek K, Jesinghaus M, Steiger K. Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Ferret and Human Intestinal Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 25;13(23):5941. <https://doi.org/10.3390/cancers13235941>. PMID: 34885050; PMCID: PMC8656578.
3. Archer KR, **Groll T**, Harvey RJ, Thornton SM, Stidworthy MF, Denk D. Case series: Lymphoid neoplasia in three elasmobranch species. *J Fish Dis*. 2023 Mar;46(3):273-279. <https://doi.org/10.1111/jfd.13742>. Epub 2022 Dec 23. PMID: 36562278.
4. Reiser J, Kreuzer M, Werner J, Saller AM, Fischer J, Senf S, Deffner P, Abendschön N, **Groll T**, Grott A, Miller R, Bergmann S, Erhard MH, Ritzmann M, Zöls S, Schneider G, Steiger K, Baumgartner C. Nociception-Induced Changes in Electroencephalographic Activity and FOS Protein Expression in Piglets Undergoing Castration under Isoflurane Anaesthesia. *Animals (Basel)*. 2022 Sep 6;12(18):2309. <https://doi.org/10.3390/ani12182309>. PMID: 36139169; PMCID: PMC9494976.
5. Foersch S, Lang-Schwarz C, Eckstein M, Geppert C, Schmitt M, Konukiewicz B, **Groll T**, Schicktanz F, Engel J, Gleitsmann M, Westhoff CC,

- Frickel N, Litmeyer AS, Grass A, Jank P, Lange S, Tschurtschenthaler M, Wilhelm D, Roth W, Vieth M, Denkert C, Nagtegaal I, Weichert W, Jesinghaus M. pT3 colorectal cancer revisited: a multicentric study on the histological depth of invasion in more than 1000 pT3 carcinomas-proposal for a new pT3a/pT3b subclassification. *Br J Cancer*. 2022 Oct;127(7):1270-1278. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01889-1>. Epub 2022 Jul 21. PMID: 35864156; PMCID: PMC9519960.
6. Steiger K, Quigley NG, **Groll T**, Richter F, Zierke MA, Beer AJ, Weichert W, Schwaiger M, Kossatz S, Notni J. There is a world beyond $\alpha\beta 3$ -integrin: Multimeric ligands for imaging of the integrin subtypes $\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 8$, $\alpha\beta 3$, and $\alpha 5\beta 1$ by positron emission tomography. *EJNMMI Res*. 2021 Oct 12;11(1):106. <https://doi.org/10.1186/s13550-021-00842-2>. PMID: 34636990; PMCID: PMC8506476.
 7. Konukiewitz B, Kasajima A, Schmitt M, Schwamborn K, **Groll T**, Schick-tanz F, Delbridge C, Schütze LM, Wilhelm D, Lang C, Lange S, Foersch S, Jank P, Steiger K, Werder AV, Denkert C, Weichert W, Klöppel G, Jesinghaus M. Neuroendocrine Differentiation in Conventional Colorectal Adenocarcinomas: Incidental Finding or Prognostic Biomarker? *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 12;13(20):5111. <https://doi.org/10.3390/cancers13205111>. PMID: 34680258; PMCID: PMC8533893.
 8. Schmidt O, Nehls N, Prexler C, von Heyking K, **Groll T**, Pardon K, Garcia HD, Hensel T, Gürgen D, Henssen AG, Eggert A, Steiger K, Burdach S, Richter GHS. Class I histone deacetylases (HDAC) critically contribute to Ewing sarcoma pathogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Oct 15;40(1):322. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02125-z>. Erratum in: *J Exp Clin Cancer Res*. 2022 Jan 3;41(1):7. PMID: 34654445; PMCID: PMC8518288.
 9. Krabbe T, Marek J, **Groll T**, Steiger K, Schmid RM, Krackhardt AM, Al-tomonte J. Adoptive T Cell Therapy Is Complemented by Oncolytic Viro-therapy with Fusogenic VSV-NDV in Combination Treatment of Murine Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 2;13(5):1044. <https://doi.org/10.3390/cancers13051044>. PMID: 33801359; PMCID: PMC7958625.

2 Beiträge auf wissenschaftlichen Tagungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als **Vortrag** auf dem **ESTP/ESVP/ECV Cutting Edge Pathology Congress 2021** präsentiert und mit dem **1. Vortragspreis der Oncology Session** ausgezeichnet sowie als zitierfähiger Abstract veröffentlicht:

Groll T, Jesinghaus M, Denk D, Schwittlick U, Aupperle-Lellbach H, Sarker RSJ, Mogler C, Pfarr N, Steiger K. Bridging the Species Gap – Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas. *Journal of Comparative Pathology* 2022 Vol. 191 Page 10.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.11.022>.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Posterbeitrag im Rahmen der **64. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) 2021** präsentiert und als zitierfähiger Abstract veröffentlicht:

Groll T, Matiasek K, Aupperle-Lellbach H, Schwittlick U, Ronderos MD, Mogler C, Weichert W, Steiger K. Die Rolle unterschiedlicher Mastzellsubtypen im Rahmen der intestinalen Karzinogenese – ein Spezies-vergleichender Ansatz. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere* 2021. Vol. 49 Issue 03 Pages P10.
<https://doi.org/10.1055/s-0041-1729423>.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Posterbeitrag im Rahmen der **104. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) 2020** präsentiert:

Groll T, Matiasek K, Kuhn S, Reiser M, Weichert W, Steiger K. The role of different mast cell subtypes within intestinal carcinogenesis: A comparative approach.

Zitierfähiger Abstract und weiterer Posterbeitrag im Rahmen der **63. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der DVG 2020**:

Groll T, Grashei M, Kahl S, Schilling F, Meyer-Lindenberg A, Hirschberger J, Matiasek K, Baumgartner C, Weichert W, Steiger K. Koregistrierung multimodaler Bildgebung mit der pathohistologischen Aufarbeitung am Beispiel des felinen Injektions-assoziierten Sarkoms. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere* 2020. Vol 48 Issue 03 Pages P05. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1712572>.

XIII ANHANG

1 Materialien

1.1 Geräte

Tabelle A1 | Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Eindeckautomat	CTM6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluorometer	Qubit 4.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Imager	Amersham Imager 680	General Electric Company Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
IHC Autostainer	Bond™ RX ^m	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
IHC Autostainer	Ventana BenchMark XT	Ventana Medical Systems, Tucson, USA
Kapillarsequenzierer	AB/Hitachi 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlplatte	COP 30 Cooling Plate	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Maxwell® RSC Instrument (automatisierte DNA-Extraktion)	Maxwell® RSC Instrument	Promega, Madison, USA
PCR Thermocycler	Mastercycler® gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Hanna HI208 pH-Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Rotationsmikrotom	RM2245	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Rotationsmikrotom	Microm HM355S	Thermo Scientific, Waltham, USA
Slide-Scanner	Aperio AT2 Whole-Slide-Scanner	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Thermoschüttler	Thermal Shake <i>lite</i>	VWR International, Radnor, USA
Monitor mit Touch-Pen	Wacom Cintiq 22HD	Kazo, Saitama, Japan
Vortexmischer	MS1 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortexmischer	MS3 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

Wärmeschrank	Inkubator (38 °C bzw. 68 °C)	Memmert, Büchenbach, Deutschland
Wasserbad	W20	VWR International, Radnor, USA
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Micro Centrifuge 100 VAC	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge	Mini-star bench centrifuge	VWR International, Radnor, USA

1.2 Software

Tabelle A2 | Verwendete Software.

Name	Version	Hersteller
Aperio ImageScope x64	12.4.0.7018	Leica Biosystems Pathology Imaging, Wetzlar, Deutschland
CorelDRAW Graphics Suite	2020	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Microsoft Office	2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
QuPath	0.3.0	Open-Source Software der University of Edinburgh, Schottland (BANKHEAD et al., 2017)
SPSS Statistics	Version 27	SPSS Inc, Chicago, USA

1.3 Weitere Materialien

Tabelle A3 | Weitere verwendete Materialien.

Art	Typ	Hersteller
Einmalskalpell	10 sterile Einmal-Skalpelle	Paragon®, England/ neo-Lab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mehrzweck-Marker	Marker mit synthetischer Spitze	Avantor by VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger für HE	TopFrost Objektträger mit farbigem Beschriftungsrand	LABOCON, Hofheim, Deutschland
Objektträger für IHC	Menzel-Gläser SUPER-FROST® PLUS	Thermo Scientific, Waltham, USA
Objektträgerboxen	Medite Objektträger Archivkarton	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Permanent Marker	Lumocolor Duo, wasserfest	Staedtler, Nürnberg, Deutschland
Plastikröhrchen	Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Pipette	Research® 100µl, 10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette	Research® Plus 5ml, 1000µl, 200µl, 100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Probenröhrchen	Eppendorf-Röhrchen 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
96-well Platten	Quali-PCR-Platten, 96 well mit Rahmen – transparent (G060)	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, Deutschland

1.4 Histochemische Färbelösungen und Reagenzien für Paraffinschnitte

Tabelle A4 | Reagenzien für histochemische Färbungen.

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Aqua dest/VE Wasser		
Eisessig 100 %	EMSURE® Merck, Darmstadt, Deutschland	100063
Eosin Y Lösung (1 %) ethanolisch	Waldeck, Münster, Deutschland	2C-284
Hämalaun, sauer nach Mayer	Waldeck, Münster, Deutschland	2E-038
Toluidinblau O	Waldeck, Münster, Deutschland	1B-481.00010

1.5 Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie

1.5.1 Primärantikörper

Tabelle A5 | Primärantikörper für humanes, murines, felines FFPE-Gewebe.

Antikörperbezeichnung	Klon	Wirt (Iso-tyt)	Hersteller /Vertrieb (Bestellnummer)	Verdünnung	System, IHC-Protokoll	Kontrolle
Primärantikörper für humanes Gewebe						
Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit	-	Kaninchen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark (A450229-2)	1:200	Ventana BenchMark XT, Protokoll-Nr. 404 T CC1 st. /20	Humanes Kolon
Mast Cell Chymase Monoclonal Antibody	CC1	Maus (IgG1)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (MA5-11717)	1:2000	Ventana BenchMark XT, Protokoll-Nr. 303 T CeP CC1 mild	Humane Haut, Lunge

Anhang

Monoclonal Mouse Anti-Human Collagen IV	CIV 22	Maus	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark (M078501-2)	1:25	Bond™ RX ^m , Sequenzielle Doppelfärbung (IHCMouD1 IHCMouD2)	Humane Haut
Polyclonal Histamine Antibody	-	Kaninchen (IgG)	LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA/Biozol (LS-C67884)	1:1500	Bond™ RX ^m , IHCRab (H1/30)	Humane Haut
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67	MIB-1	Maus (IgG1, kappa)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark (M724001-2)	1:50	Ventana Benchmark XT, Protokoll-Nr. 338 Ki-67 Dako	Humane Tonsille
Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase	AA1	Maus (IgG1, kappa)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark (M705229-2)	1:500	Ventana Benchmark XT, Protokoll-Nr. 174 Protease 4/16	Humane Tonsille, Haut
Primärantikörper für murines Gewebe						
Anti-Mouse Collagen Type IV	-	Kaninchen (IgG)	Cedarlane, Burlington, Kanada (CL50451A P)	1:100	Bond™ RX ^m , Sequenzielle Doppelfärbung, IHCRATD1 IH-CRdRab	Murine Haut
Polyclonal Rabbit Anti-Cytokeratin, Wide Spectrum	-	Kaninchen (Ig fraction)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark (Z062201-2)	1:750	Bond™ RX ^m , IHCRab (E2/20)	Muriner Darm
Polyclonal Anti-Granzyme B antibody	-	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK (ab4059)	1:1000	Bond™ RX ^m , IHCRab (H1/20)	Murine Milz
Polyclonal Histamine Antibody	-	Kaninchen (IgG)	LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA/Biozol (LS-C67884)	1:1500	Bond™ RX ^m , IHCRab (H1/20)	Muriner Magen
Interleukin-5 (IL-5) Polyclonal Antibody	-	Kaninchen (IgG)	Bioss Antibodies, Woburn, USA/Biozol (BSS-BS-1318R)	1:400	Bond™ RX ^m , IHCRab (H1/20)	Murine Lunge

Anhang

Recombinant Anti-Ki-67 Antibody (sp6)	-	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK (ab16667)	1:50	Bond™ RX ^m , IHC Rab (H1/20)	Murine Milz
TPSAB1/Mast Cell Tryptase Antibody	-	Kaninchen (IgG)	LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA/Biozol (LS-C331832)	1:1000	Bond™ RX ^m , IHC RbBSA (H1/30)	Murine Haut
MCPT-1 (mMCP-1) Monoclonal Antibody	RF6.1	Ratte (IgG1)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (14-5503-82)	1:30	Bond™ RX ^m , IHCDABR (H1/30)	Muriner Darm, hyperplastisch
Mcpt4 Antibody (aa114-126), Unconjugated, Goat, Polyclonal	-	Ziege	LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA/Biozol (LS-B5958)	1:3000	Bond™ RX ^m , IHCDABG (H1/30)	Murine Haut
MMP9/Gelatinase B Antibody	-	Kaninchen (IgG)	LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA/Biozol (LS-B2486)	1:200	Bond™ RX ^m , IHC Rab (H1/20)	Murines Knochenmark
Primärantikörper für felines Gewebe						
Recombinant Rabbit Anti-β-catenin	E247	Kaninchen	Abcam (ab32572)	1:200	Bond™ RX ^m , IHC Rab (H1/20)	Felines Kolon
Polyclonal Histamine Antibody	-	Kaninchen (IgG)	LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA/Biozol (LS-C67884)	1:1500	Bond™ RX ^m , IHC Rab (H2/10)	Feline Haut
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67	MIB-1	Maus (IgG1 kappa)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark (M724001-2)	1:50	Ventana BenchMark XT, Protokoll-Nr. 338 T Ki-67 Dako	Felines Fibrosarkom, Darm
Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase	AA1	Maus (IgG1 kappa)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark (M705229-2)	1:500	Ventana BenchMark XT, Protokoll-Nr. 174 Protease 4/16	Feline Haut

1.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle A6 | Sekundärantikörper.

Sekundärantikörperbezeichnung	Wirt (Iso- typ)	Hersteller/Vertrieb (Bestell-Nr.)	Verdün- nung	IHC-Protokoll	Primär- AK
Rabbit Anti-Goat IgG Antibody (H+L), Unconjugated	Kaninchen (IgG)	Vector Laboratories, Burlingame, USA/Biozol (AI-5000)	1:1000	Bond™ RX ^m , IHCDABG	MCPT-4
Rabbit Anti-Rat IgG Antibody (H+L), Mouse Adsorbed, Unconjugated	Kaninchen (IgG)	Vector Laboratories, Burlingame, USA/Biozol (AI-4001)	1:400	Bond™ RX ^m , IHCDABR	MCPT-1

1.5.3 Negativkontrollen

Bei jeder immunhistochemischen Reaktion wurden neben Positivkontrollen (siehe Tabelle A5/Kontrollgewebe) methodische Negativkontrollen (siehe Tabelle A7) mitgeführt, um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen. Anstelle des Primärantikörpers wurde normales Serum (polyklonale AK) oder eine Immunglobulinfraktion als Isotypenkontrolle (mono- und polyklonale AK) eingesetzt. Zudem wurden technische Kontrollen (nur AK-Verdünnungsmittel, ohne Zusatz von Primärantikörper) sowie externe Gewebekontrollen mitgeführt.

Tabelle A7 | Negativkontrollen.

Reagenz	Hersteller/Vertrieb	Bestellnummer
Bond™ Primary Antibody Diluent (AK-Verdünnungsmittel Bond™ RX ^m)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	AR9352
Antibody Dilution Buffer (AK-Verdünnungsmittel Ventana XT)	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA/Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05261899001
Normal Goat Serum (normales Ziegen Serum)	Abcam, Cambridge, UK	ab7481
Normal Rabbit Serum (normales Kaninchenserum) (10 %)	KPL, Gaithersburg, USA/Medac, Wedel, Deutschland	71-00-28
Rabbit IgG, monoclonal (EPR25A) Isotype Control (Kaninchen IgG Isotypenkontrolle) [1,775 mg/ml]	Abcam, Cambridge, UK	ab172730
Rat IgG1 kappa Isotype Control (eBRG1) (Ratten)	eBioscience™ Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	14-4301-82

IgG1 kappa Isotypenkontrolle) [0,5 mg/ml]		
---	--	--

1.5.4 Weitere Reagenzien für Immunhistochemie

Tabelle A8 | Weitere Reagenzien für IHC.

Name	Hersteller; Vertrieb	Artikel-/Bestellnummer
Aqua dest./vollentsalztes Wasser (VE Wasser)		
Antibody Dilution Buffer (AK Verdünnungsmittel Ventana XT)	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05261899001
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Deutschland	A9647
Bond™ Primary Antibody Diluent (AK Verdünnungsmittel Bond™ RX ^m)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	AR9352
Bond™ Enzyme Pretreatment (E1/E2)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	AR9551
Bond™ Epitope Retrieval Solution 1 (ER1), Citrat, pH 6	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	AR9961
Bond™ Epitope Retrieval Solution 2 (ER2), EDTA, pH 9	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	AR9640
Bond™ Dewax Solution	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	AR9222
Bond™ Wash Solution 10× Concentrate	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	AR9590
Cell Conditioning Solution (CC1), Tris-EDTA based buffer pH 7.8	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05279801001
Cell Conditioning Solution (CC2)	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05279798001
Cytoseal™ XYL	Epredia™ Richard-Allan Scientific, Subsidiary of Thermo Scientific, Kalamazoo, USA	8312-4
EZ Prep Concentrate (10×)	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05279771001
Hämatoxylin (HTX)-Lösung (für Ventana XT)	4,75 ml Harris HTX (Sigma Aldrich/Merck Darmstadt, Deutschland) 4,75 ml HTX nach Mayer (Waldeck, Münster, Deutschland)	HHS32 2E-038

	8,5 ml Eisessig (EMSURE® Merck, Darmstadt, Deutschland) 9,0 ml Aqua dest.	100063
Liquid Cover Slip, LCS (Predilute)	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05264839001
Protease 1	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05266688001
Reaction Buffer Concentrate, Tris-based buffer pH 7.6-7.8 (10×)	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05353955001

1.5.5 Kommerzielle Kits

Tabelle A9 | Kommerzielle Kits.

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Leica Bond™ Polymer Refine Detection (Peroxid-Block (H ₂ O ₂), Post Primary (Kaninchen-anti-Maus-IgG), Polymer (Anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG), DAB, H ₂ O ₂ in Stabilisatorlösung, Hämatoxylin)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	DS9800
Leica Bond™ Polymer Refine Red Detection (Post Primary Alkalische Phosphatase (AP) (Kaninchen-anti-Maus-IgG), Polymer AP (Anti-Kaninchen-Poly-AP-IgG), Red Part A-D, Hämatoxylin)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	DS9390
Ventana <i>ultraView</i> Kit (Universal DAB Inhibitor (3 % H ₂ O ₂), Universal HRP Multimer, Universal DAB Chromogen, Universal DAB H ₂ O ₂ (0,04 % H ₂ O ₂), Universal DAB Copper (5 g/L CuSO ₄), Bluing Reagent (0,1 M Li ₂ CO ₃ , 0,5 M Na ₂ CO ₃))	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	05269806001

1.6 Reagenzien/Kits für DNA-Extraktion, PCR und Sanger-Sequenzierung

Tabelle A10 | Reagenzien und Kits für DNA-Extraktion, Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sanger-Sequenzierung.

Reagenz/Kit	Hersteller	Bestellnummer
Aqua dest/VE Wasser		
AmpliTaq Gold Polymerase with Buffer I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	N8080244
BigDye v.1.1 Terminator Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4337452
Elution Buffer	Promega, Madison, USA	A828D
Exonuklease I (Exo I)	New England Biolabs, Ipswich, USA	M0293
HiDi™ Formamid	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4311320
Incubation Buffer	Promega, Madison, USA	D920B
Lysis Buffer	Promega, Madison, USA	MC501C
Maxwell® RSC Blood DNA Kit (Proteinase K, Incubation Buffer, Lysis Buffer, Nuclease-free H ₂ O)	Promega, Madison, USA	AS1400
Nuklease-freies H ₂ O	Ambion™, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	AM9937
Proteinase K Solution	Promega, Madison, USA	MC500C
Qubit™ 1X dsDNA Assay-Kit mit hoher Empfindlichkeit (HS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Q33231
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	New England Biolabs, Ipswich, USA	M0371
ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit™	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	D4051

1.6.1 Primer

Der in dieser Arbeit verwendete Primer, der das feline *CTNNB1* Exon 2 umfasst (237 Basenpaare), wurde von der Firma Metabion International AG (Planegg, Deutschland) hergestellt. Die Sequenz (5' → 3') lautet wie folgt:

ctnbn1_cat_F AGC TGA TCT GAT GGA ACT GGA C

ctnbn1_cat_R ACA CCC TTA CCA GCC ACT TG

2 Methoden

2.1 Anfertigung histologischer Schnitte

Für histochemische Färbungen und immunhistochemische Experimente wurden mittels eines Rotationsmikrotoms (Microm HM355S, Thermo Fisher und RM2245, Leica) aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe 2 µm starke, konsekutive Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden zunächst mittels einer Pinzette in ein raumtemperiertes Wasserbad und anschließend zum Zwecke der Streckung in ein heißes Wasserbad (ca. 48 °C) überführt. So konnten die Schnitte möglichst faltenlos auf Objektträger (OT) aufgezogen werden. Die Trocknung der Schnitte erfolgte bei 38 °C im Wärmeschrank über Nacht. Anschließend wurden HE- und TB-Übersichtsfärbungen angefertigt und die Schnitte automatisiert mittels eines Eindeckautomaten (CTM6, Thermo Fisher) mit xylolbasiertem Eindeckmedium (Cytoseal™ XYL, Thermo Fisher) eingedeckt. Die Lagerung der Leerschnitte für IHC erfolgte bei Dunkelheit und Raumtemperatur in Objektträgerboxen (MEDITE Medical GmbH) bzw. Archivschubladensystemen.

2.2 Kohorten

Tabelle A11 | Kohorten für Untersuchungen von MZ-Subpopulationen im Rahmen der intestinalen Karzinogenese.

Humane Kohorte	104
Low-grade Adenom (niedriggradige interepitheliale Neoplasien)	17
High-grade Adenom (hochgradige interepitheliale Neoplasien)	12
Kolorektales Karzinom	75
Murine Kohorte (Anzahl der Läsionen)	274
Atypische Hyperplasie (gesamt)	52
Low-grade Adenom (gesamt)	40
High-grade Adenom (gesamt)	122
Karzinom (gesamt)	60
Genetisch modifizierte Mausmodelle (Anzahl untersuchter Läsionen pro Modell)	274
1. <i>Villin^{Cre};Apc^{flox/flox}</i>	49
2. <i>Villin^{Cre};Braf^{V637E/+}</i>	20
3. <i>Villin^{Cre};Kras^{G12D/+}</i>	4
4. <i>Catnb^{Aex3};Villin^{CreERT2}</i>	26
5. <i>Catnb^{Aex3}</i> und IE-CBM defizient	22
6. IZ CBM-defizient	22

7. IE CBM-defizient	33
8. CBM Knockout (KO)	7
9. <i>IFNy</i> ^{-/-}	7
10. <i>Bcl10</i> ^{-/-} ; <i>IFNy</i> ^{-/-}	7
11. Komplexe Modelle mit <i>Apc</i> ^{flox/flox} ; <i>Kras</i> ^{G12D/+} Hintergrund	21
12. Wildtyp (WT)	56
CBM: CARD/BCL10/MALT1; IE: Intestinale Epithelzellen; IZ: Immunzellpopulation	
Feline Kohorte	51
Adenom (Dünn- und Dickdarm)	2
Dünndarmkarzinom	16
Dickdarmkarzinom	33

Die felines Kohorten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von LABOKLIN, Bad Kissingen, Deutschland (feline Karzinome) und SYNLAB UK & Ireland (feline Adenome).

2.3 Histochemische Färbungen

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin

Tabelle A12 | Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbeprotokoll.

Zeit (min:s)	Reagenz
30:00	Wärmeschrank (70 °C)
05:00	Xylol
05:00	Xylol
05:00	Isopropanol
05:00	Isopropanol
02:00	Ethanol 96 %
02:00	Ethanol 96 %
02:00	Ethanol 70 %
02:00	Ethanol 70 %
00:25	Aqua dest.
08:00	Hämalaun nach Mayer
10:00	Fließendes Leitungswasser
04:00	Ethanolisches Eosin 1 %
00:30	Ethanol 70 %
00:30	Ethanol 96 %
00:25	Isopropanol
00:25	Isopropanol
01:30	Xylol
01:30	Xylol
Eindecken	Cytoseal™ XYL

2.3.2 Toluidinblau

Aus 1 g Toluidinblau (TB) O (Feststoff) und 100 ml 70 % Ethanol wurde eine TB-Vorratslösung hergestellt. In 50 ml destilliertem Wasser wurden 0,5 g Natriumchlorid (NaCl) 1 % gelöst und so eine Verbrauchslösung generiert. Mittels Eisessigs wurde unter Zuhilfenahme eines pH-Meters (Hanna Instruments) der pH-Wert der Verbrauchslösung auf pH 2 bis 2.5 titriert. 5 ml der TB-Vorratslösung sowie 45 ml der NaCl-Lösung wurden direkt vor dem Färbevorgang zu einer TB-Färbelösung vermischt und der pH-Wert auf ca. pH 2.3 (< 2.5) eingestellt. Diese Arbeitslösung wurde für jeden Färbevorgang frisch hergestellt. Als Positivkontrollen wurden kutane FFPE-Schnitte (BGMZ⁺) der jeweiligen Spezies mitgeführt.

Tabelle A13 | Toluidinblaufärbeprotokoll modifiziert nach WebPath: Internet Pathology Laboratory (abgerufen am 24.06.2020) (WEBPATH), mit freundlicher Genehmigung durch Edward C. Klatt, Department of Biomedical Sciences, Savannah, GA, USA.

Zeit (min:s)	Reagenz
30:00	Wärmeschrank
05:00	Xylol
05:00	Xylol
05:00	Isopropanol
05:00	Isopropanol
02:00	Ethanol 96 %
02:00	Ethanol 96 %
02:00	Ethanol 70 %
02:00	Ethanol 70 %
01:00	Aqua dest.
02:00	TB Arbeitslösung (5 ml TB-Vorratslösung und 45 ml NaCl 1 %)
3x Eintauchen	Aqua dest.
10x Eintauchen	Ethanol 96 %
10x Eintauchen	Isopropanol
10x Eintauchen	Isopropanol
03:00	Xylol
03:00	Xylol
Eindecken	Cytoseal TM XYL

2.4 Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Experimente wurden an vollautomatischen IHC-Fär-

besystemen, dem Bond™ RX^m von Leica Biosystems, sowie dem Ventana BenchMark XT System von Roche, in der Abteilung CEP des Instituts für Pathologie der TUM durchgeführt. Hierbei erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte standardisiert innerhalb des automatisierten Durchgangs. Bei Nichtangabe der Temperatur wurden die Schritte bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

2.4.1 Immunhistochemische Protokolle Leica Bond™ RX^m

Tabelle A14 | IHC-Protokoll Kaninchen-Primärantikörper („IHC Rab“).

Schrittnummer	Schritt/Reagenz (mit * gekennzeichnete Lösungen sind von Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)	Inkubationszeit (min:s)
1	*Entparaffinierung (72 °C)	00:30
2	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
3	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
4	*Vorbehandlung (H1 (Citrat) bzw. H2 (EDTA)) (Raumtemperatur (RT))	00:00
5	*Vorbehandlung (H1/H2) (RT)	00:00
6	*Vorbehandlung (H1/H2) (100 °C)	10:00 – 30:00 (AK-abhängig)
7	*Vorbehandlung (H1/H2) (RT)	12:00
8	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
9	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
10	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
11	*Bond Waschpuffer	03:00
12	*Peroxid Block (RT)	05:00
13	*Bond Waschpuffer	00:00
14	*Bond Waschpuffer	00:00
15	*Bond Waschpuffer	00:00
16	Primärantikörper (RT)	15:00
17	*Bond Waschpuffer	00:00
18	*Bond Waschpuffer	00:00
19	*Bond Waschpuffer	00:00
20	*Polymer (anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG) (RT)	08:00
21	*Bond Waschpuffer	02:00
22	*Bond Waschpuffer	02:00
23	Aqua dest.	00:00
24	*Bond Mixed DAB Refine (RT)	01:00
25	*Bond Mixed DAB Refine (RT)	10:00
26	Aqua dest.	00:00
27	Aqua dest.	00:00

28	Aqua dest.	00:00
29	*Hämatoxylin (RT)	05:00
30	Aqua dest.	00:00
31	*Bond Waschpuffer	00:30
32	*Bond Waschpuffer	00:30

Schritte 4-11 bei enzymatischer Vorbehandlung entsprechend ersetzt durch:

Schrittnummer	Schritt/Reagenz (mit * gekennzeichnete Lösungen sind von Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)	Inkubationszeit (min:s)
4	*Bond Waschpuffer	00:00
5	*Enzym 1 bzw. 2 (37 °C)	10:00-20:00 (AK-abhängig)
6	*Bond Waschpuffer	00:00
7	*Bond Waschpuffer	00:00
8	*Bond Waschpuffer	00:00

Tabelle A15 | IHC-Protokoll Kaninchen-Primärantikörper mit bovinem Serum Albumin (BSA) (1 %) Block („IHCrbBSA“).

Schrittnummer	Schritt/Reagenz (mit * gekennzeichnete Lösungen sind von Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)	Inkubationszeit (min:s)
1	*Entparaffinierung (72 °C)	00:30
2	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
3	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
4	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
5	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
6	*Vorbehandlung (H1) (100 °C)	30:00
7	*Vorbehandlung (H1) (RT)	12:00
8	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
9	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
10	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
11	*Bond Waschpuffer	03:00
12	*Peroxid Block (RT)	08:00
13	*Bond Waschpuffer	00:00
14	*Bond Waschpuffer	00:00
15	*Bond Waschpuffer	00:00
16	BSA-Block (1 %)	30:00
17	*Bond Waschpuffer	00:00
18	*Bond Waschpuffer	00:00
19	*Bond Waschpuffer	00:00
20	Primärantikörper (RT)	20:00

21	*Bond Waschpuffer	02:00
22	*Bond Waschpuffer	02:00
23	*Bond Waschpuffer	00:00
24	*Polymer (anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG) (RT)	10:00
25	*Bond Waschpuffer	10:00
26	*Bond Waschpuffer	00:00
27	Aqua dest.	00:00
28	*Mixed DAB Refine (RT)	01:00
29	*Mixed DAB Refine (RT)	10:00
30	Aqua dest.	00:00
31	Aqua dest.	00:30
32	Aqua dest.	00:30
33	*Hämatoxylin (RT)	05:00
34	Aqua dest.	00:00
35	*Bond Waschpuffer	00:30
36	*Bond Waschpuffer	00:30

Tabelle A16 | IHC-Protokoll Ratten-Primärantikörper („IHC DAB“).

Schritt- nummer	Schritt/Reagenz (mit * gekennzeichnete Lösungen sind von Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)	Inkubationszeit (min:s)
1	*Entparaffinierung (72 °C)	00:30
2	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
3	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
4	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
5	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
6	*Vorbehandlung (H1) (100 °C)	30:00
7	*Vorbehandlung (H1) (RT)	12:00
8	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
9	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
10	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
11	*Bond Waschpuffer	03:00
12	*Peroxid Block (RT)	05:00
13	*Bond Waschpuffer	00:00
14	*Bond Waschpuffer	00:00
15	*Bond Waschpuffer	00:00
16	Primärantikörper (RT)	15:00
17	*Bond Waschpuffer	00:00
18	*Bond Waschpuffer	00:00
19	*Bond Waschpuffer	00:00

Anhang

20	Unkonjugierter Kaninchen anti-Ratte Sekundärantikörper (RT)	30:00
21	*Bond Waschpuffer	02:00
22	*Bond Waschpuffer	02:00
23	*Bond Waschpuffer	02:00
24	*Polymer (anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG) (RT)	08:00
25	*Bond Waschpuffer	02:00
26	*Bond Waschpuffer	02:00
27	Aqua dest.	00:00
28	*Mixed DAB Refine (RT)	01:00
29	*Mixed DAB Refine (RT)	10:00
30	Aqua dest.	00:00
31	Aqua dest.	00:00
32	Aqua dest.	00:00
33	*Hämatoxylin (RT)	05:00
34	Aqua dest.	00:00
35	*Bond Waschpuffer	00:00
36	Aqua dest.	00:00

Tabelle A17 | IHC-Protokoll Ziegen-Primärantikörper („IHC DABG“).

Schrittnummer	Schritt/Reagenz (mit * gekennzeichnete Lösungen sind von Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)	Inkubationszeit (min:s)
1	*Entparaffinierung (72 °C)	00:30
2	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
3	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
4	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
5	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
6	*Vorbehandlung (H1) (100 °C)	30:00
7	*Vorbehandlung (H1) (RT)	12:00
8	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
9	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
10	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
11	*Bond Waschpuffer	03:00
12	*Peroxid Block (RT)	05:00
13	*Bond Waschpuffer	00:00
14	*Bond Waschpuffer	00:00
15	*Bond Waschpuffer	00:00
16	Primärantikörper (RT)	15:00
17	*Bond Waschpuffer	00:00
18	*Bond Waschpuffer	00:00

Anhang

19	*Bond Waschpuffer	00:00
20	Unkonjugierter Kaninchen anti-Ziege Sekundärantikörper (RT)	30:00
21	*Bond Waschpuffer	02:00
22	*Bond Waschpuffer	02:00
23	*Bond Waschpuffer	02:00
24	*Polymer (anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG) (RT)	08:00
25	*Bond Waschpuffer	02:00
26	*Bond Waschpuffer	02:00
27	Aqua dest.	00:00
28	*Mixed DAB Refine (RT)	01:00
29	*Mixed DAB Refine (RT)	10:00
30	Aqua dest.	00:00
31	Aqua dest.	00:00
32	Aqua dest.	00:00
33	*Hämatoxylin (RT)	05:00
34	Aqua dest.	00:00
35	*Bond Waschpuffer	00:00
36	Aqua dest.	00:00

Tabelle A18 | Sequenzielle Doppelfärbung („IHCRA1D1IHCRA1dRab“).

Schrittnummer	Schritt/Reagenz (mit * gekennzeichnete Lösungen sind von Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)	Inkubationszeit (min:s)
1	*Entparaffinierung (72 °C)	00:30
2	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
3	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
4	*Bond Waschpuffer	00:00
5	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
6	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
7	*Vorbehandlung (H1) (100 °C)	30:00
8	*Vorbehandlung (H1) (RT)	12:00
9	*Bond Waschpuffer	00:00
10	*Bond Waschpuffer	00:00
11	*Bond Waschpuffer	00:00
12	*Peroxid Block (RT)	05:00
13	*Bond Waschpuffer	00:00
14	*Bond Waschpuffer	00:00
15	*Bond Waschpuffer	00:00
16	Primärantikörper 1 (RT) (MCPT1)	15:00
17	*Bond Waschpuffer	00:00

Anhang

18	*Bond Waschpuffer	00:00
19	*Bond Waschpuffer	00:00
20	Unkonjugierter Kaninchen anti-Ratte Sekundäran- tikörper (RT)	30:00
21	*Bond Waschpuffer	02:00
22	*Bond Waschpuffer	02:00
23	*Bond Waschpuffer	02:00
24	*Polymer (anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG) (RT)	08:00
25	*Bond Waschpuffer	02:00
26	*Bond Waschpuffer	02:00
27	Aqua dest.	00:00
28	*Mixed DAB Refine (RT)	00:00
29	*Mixed DAB Refine (RT)	10:00
30	Aqua dest.	00:00
31	Aqua dest.	00:00
32	Aqua dest.	00:00
33	Aqua dest.	00:00
34	*Bond Waschpuffer	00:00
35	*Enzyme 1 (37 °C)	10:00
36	*Bond Waschpuffer	00:00
37	*Bond Waschpuffer	00:00
38	*Bond Waschpuffer	00:00
39	Primäranantikörper 2 (RT) (Kaninchen anti-Maus Kollagen IV)	15:00
40	*Bond Waschpuffer	02:00
41	*Bond Waschpuffer	02:00
42	*Bond Waschpuffer	02:00
43	*Polymer AP (anti-Kaninchen-Poly-AP-IgG)	30:00
44	*Bond Waschpuffer	02:00
45	*Bond Waschpuffer	02:00
46	*Bond Waschpuffer	05:00
47	*Bond Waschpuffer	02:00
48	*Bond Waschpuffer	00:00
49	Aqua dest.	00:00
50	*Mixed Red Refine	10:00
51	*Mixed Red Refine	05:00
52	Aqua dest.	00:00
53	Aqua dest.	00:00
54	*Bond Waschpuffer	00:00
55	*Bond Waschpuffer	00:00

56	*Bond Waschpuffer	00:00
57	*Hämatoxylin (RT)	05:00
58	Aqua dest.	00:00
59	*Bond Waschpuffer	00:00
60	Aqua dest.	00:00

Tabelle A19 | Sequenzielle Doppelfärbung („IHC MouD1 IHC MouD2“).

Schrittnummer	Schritt/Reagenz (mit * gekennzeichnete Lösungen sind von Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)	Inkubationszeit (min:s)
1	*Entparaffinierung (72 °C)	00:30
2	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
3	*Entparaffinierung (72 °C)	00:00
4	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
5	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
6	*Vorbehandlung (H1) (100 °C)	20:00
7	*Vorbehandlung (H1) (RT)	12:00
8	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
9	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
10	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
11	*Bond Waschpuffer (RT)	03:00
12	*Peroxid Block (RT)	10:00
13	Primärantikörper 1 (RT) (anti-humane MZ-Chymase bzw. Tryptase)	30:00
14	*Bond Waschpuffer	00:00
15	*Bond Waschpuffer	00:00
16	*Bond Waschpuffer	00:00
17	*Post Primary Kaninchen-anti-Maus-IgG (RT)	30:00
18	*Bond Waschpuffer	02:00
19	*Bond Waschpuffer	02:00
20	*Bond Waschpuffer	02:00
21	*Polymer (anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG) (RT)	08:00
22	*Bond Waschpuffer	02:00
23	*Bond Waschpuffer	02:00
24	Aqua dest.	00:00
25	*Mixed DAB Refine (RT)	00:00
26	*Mixed DAB Refine (RT)	10:00
27	Aqua dest.	00:00
28	Aqua dest.	00:00
29	Aqua dest.	00:00
30	Aqua dest.	00:00

Anhang

31	*Bond Waschpuffer	00:00
32	*Bond Waschpuffer	00:00
33	*Bond Waschpuffer	00:00
34	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
35	*Vorbehandlung (H1) (RT)	00:00
36	*Vorbehandlung (H1) (100 °C)	30:00
37	*Vorbehandlung (H1) (RT)	12:00
38	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
39	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
40	*Bond Waschpuffer (35 °C)	00:00
41	*Bond Waschpuffer	03:00
42	Primärantikörper 2 (RT) (Maus anti-human Kollagen IV)	15:00
43	*Bond Waschpuffer	00:00
44	*Bond Waschpuffer	00:00
45	*Bond Waschpuffer	00:00
46	*Post Primary AP (Kaninchen-anti-Maus-IgG) (RT)	30:00
47	*Bond Waschpuffer	02:00
48	*Bond Waschpuffer	02:00
49	*Bond Waschpuffer	02:00
50	*Polymer AP (anti-Kaninchen-Poly-AP-IgG) (RT)	30:00
51	*Bond Waschpuffer	02:00
52	*Bond Waschpuffer	02:00
53	*Bond Waschpuffer	05:00
54	*Bond Waschpuffer	02:00
55	*Bond Waschpuffer	00:00
56	Aqua dest.	00:00
57	*Mixed Red Refine	10:00
58	*Mixed Red Refine	05:00
59	Aqua dest.	00:00
60	Aqua dest.	00:00
61	*Bond Waschpuffer	00:00
62	*Bond Waschpuffer	00:00
63	*Bond Waschpuffer	00:00
64	Aqua dest.	00:00
65	*Hämatoxylin (RT)	05:00
66	Aqua dest.	00:00
67	*Bond Waschpuffer	00:00
68	Aqua dest.	00:00

2.4.2 Immunhistochemische Protokolle Ventana BenchMark XT

Alle Reagenzien (exklusive Hämatoxylin), die für die folgenden Protokolle genutzt wurden, sind von Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland.

Tabelle A20 | Ventana BenchMark XT Protokoll-Nr. 174 („Protease 4/16“) *ultraView* DAB v3.

Schrittnummer	Schritt/Reagenz	Inkubationszeit (min:s)
1	Aufheizen (EZ Prep) (75 °C)	04:00
2	OT (Objektträger) waschen	00:00
3	OT waschen	00:00
4	Aufheizen (EZ Prep) (76 °C)	04:00
5	OT waschen	00:00
6	Entparaffinierung	00:00
7	Waschvorgang, spülen mit Reaktionspuffer	00:00
8	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
9	Aufheizen bis 37 °C	04:00
10	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
11	1 Tropfen ultraView Universal DAB Inhibitor (3 % H ₂ O ₂) (37 °C), Coverslip	04:00
12	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
13	1 Tropfen von Protease 1	04:00
14	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
15	Aufheizen bis 37 °C	04:00
16	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
17	Manuelle Titration des Primärantikörpers (37 °C)	16:00
18	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
19	Aufheizen bis 37 °C	04:00
20	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
21	1 Tropfen ultraView Universal HRP Multimer (37 °C), Coverslip	08:00
22	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
23	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
24	1 Tropfen ultraView Universal DAB Chromogen und 1 Tropfen ultraView Universal DAB H ₂ O ₂ (0,04 % H ₂ O ₂) (37 °C), LCS	08:00
25	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
26	1 Tropfen ultraView Universal DAB Copper (37 °C)	04:00
27	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00

28	1 Tropfen Counterstain (Hämatoxylin-Gegenfärbung) (37 °C), LCS	08:00
29	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
30	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
31	1 Tropfen Bluing Reagent (Nach-Gegenfärbung) (37 °C), LCS	04:00
32	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
33	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00

Tabelle A21 | Ventana BenchMark XT Protokoll-Nr. 338 („Ki-67 Dako“) *ultraView* DAB v3.

Schrittnummer	Schritt/Reagenz	Inkubationszeit (min:s)
1	EZ Prep (75 °C)	04:00
2	OT waschen	00:00
3	OT waschen	00:00
4	EZ Prep (76 °C)	04:00
5	OT waschen	00:00
6	Entparaffinierung	00:00
7	OT waschen	00:00
8	Cell Conditioner Nr.1 (CC1) auftragen	00:00
9	CC1 (95 °C)	08:00
10	CC1 (100 °C)	04:00
11	CC1 (RT)	08:00
12	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
13	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
14	CC1 (37 °C)	04:00
15	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
16	1 Tropfen <i>ultraView</i> Universal DAB Inhibitor (3 % H ₂ O ₂) (37 °C)	04:00
17	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
18	Aufheizen bis 37 °C	04:00
19	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
20	Manuelle Titration Primärantikörper	00:26
21	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
22	Aufheizen bis 37 °C	04:00
23	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
24	1 Tropfen <i>ultraView</i> Universal HRP Multimer (37 °C)	08:00
25	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
26	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00

27	1 Tropfen ultraView Universal DAB Chromogen und 1 Tropfen ultraView Universal DAB H ₂ O ₂ (0,04 % H ₂ O ₂) (37 °C), LCS	08:00
28	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
29	1 Tropfen ultraView Universal DAB Copper (37 °C)	04:00
30	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
31	1 Tropfen Counterstain (Hämatoxylin-Gegenfärbung) (37 °C), LCS	08:00
32	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
33	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
34	1 Tropfen Bluing Reagent (Nach-Gegenfärbung) (37 °C), LCS	04:00
35	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
36	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00

Tabelle A22 | Ventana BenchMark XT Protokoll-Nr. 303 T („CeP CC1 mild“) *ultraView DAB v3*.

Schrittnummer	Schritt/Reagenz	Inkubationszeit (min:s)
1	EZ Prep (75 °C)	04:00
2	OT waschen	00:00
3	OT waschen	00:00
4	EZ Prep (76 °C)	04:00
5	OT waschen	00:00
6	Entparaffinierung	00:00
7	OT waschen	00:00
8	Cell Conditioner Nr.1 (CC1) auftragen	00:00
9	CC1 (95 °C)	08:00
10	CC1 (100 °C)	04:00
11	CC1 (RT)	08:00
12	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
13	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
14	CC1 (37 °C)	04:00
15	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
16	1 Tropfen ultraView Universal DAB Inhibitor (37 °C)	04:00
17	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
18	1 Tropfen ultraView Universal DAB Inhibitor (37 °C)	04:00
19	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
20	Manuelle Titration Primärantikörper (37 °C)	00:32
21	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00

Anhang

22	Aufheizen bis 37 °C	04:00
23	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
24	1 Tropfen ultraView Universal HRP Multimer (37 °C)	08:00
25	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
26	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
27	1 Tropfen ultraView Universal DAB Chromogen und 1 Tropfen ultraView Universal DAB H ₂ O ₂ (0,04 % H ₂ O ₂) (37 °C), LCS	08:00
28	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
29	1 Tropfen ultraView Universal DAB Copper (37 °C)	04:00
30	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
31	1 Tropfen Counterstain (Hämatoxylin-Gegenfärbung) (37 °C), LCS	08:00
32	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
33	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
34	1 Tropfen Bluing Reagent (Nach-Gegenfärbung) (37 °C), LCS	04:00
35	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
36	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00

Tabelle A23 | Ventana BenchMark XT Protokoll-Nr. 404 T („CC1 st. /20“) *ultraView DAB v3*.

Schrittnummer	Schritt/Reagenz	Inkubationszeit (min:s)
1	EZ Prep (75 °C)	04:00
2	OT waschen	00:00
3	OT waschen	00:00
4	EZ Prep (76 °C)	04:00
5	OT waschen	00:00
6	Entparaffinierung	00:00
7	OT waschen	00:00
8	Cell Conditioner Nr.1 (CC1) auftragen	00:00
9	CC1 (95 °C)	08:00
10	CC1 (100 °C)	04:00
11	CC1 (RT)	08:00
12	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
13	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
14	CC1 (37 °C)	04:00
15	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
16	1 Tropfen ultraView Universal DAB Inhibitor (37 °C)	04:00

17	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
18	1 Tropfen ultraView Universal DAB Inhibitor (37 °C)	04:00
19	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
20	Manuelle Titration Primärantikörper (37 °C)	00:20
21	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
22	Aufheizen bis 37 °C	04:00
23	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
24	1 Tropfen ultraView Universal HRP Multimer (37 °C)	08:00
25	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
26	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
27	1 Tropfen ultraView Universal DAB Chromogen und 1 Tropfen ultraView Universal DAB H ₂ O ₂ (0,04 % H ₂ O ₂) (37 °C), LCS	08:00
28	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
29	1 Tropfen ultraView Universal DAB Copper (37 °C)	04:00
30	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
31	1 Tropfen Counterstain (Hämatoxylin-Gegenfärbung) (37 °C), LCS	08:00
32	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
33	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
34	1 Tropfen Bluing Reagent (Nach-Gegenfärbung) (37 °C), LCS	04:00
35	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00
36	Spülen mit Reaktionspuffer	00:00

2.4.3 Entwässerungsprotokoll

Die immunhistochemischen Schnitte wurden in Anschluss an die unter Kapitel XIII.2.4.1 und XIII.2.4.2 beschriebenen IHC-Protokollen manuell entwässert.

Tabelle A24 | Entwässerungsprotokoll.

Reagenz	Zeit (min:s)
Leitungswasser mit 1-2 Tropfen Spülmittel	10x Eintauchen (nach IHC auf Ventana BenchMark XT)
Destilliertes Wasserbad	Flexibel
Ethanol 70 %	02:00
Ethanol 96 %	02:00
Ethanol 100 %	02:00

Ethanol 100 %	02:00
Xylol	02:00
Xylol	02:00
Cytoseal™ XYL	Eindeckvorgang mittels Eindeckautomaten (CTM6, Thermo Fisher)

2.5 Digitalisierung der histologischen Schnitte

Alle eingedeckten Schnittpräparate wurden nach einer Trocknungszeit von mind. 24 h mittels eines Hochdurchsatz-Scanners digitalisiert (Aperio AT2, Leica). Die Glasobjektträger wurden dafür zunächst mit 70 % Ethanol gereinigt und in Racks à 40 Schnitte verbracht. Der Scanvorgang erfolgte nach manueller Kontrolle der gesetzten Fokuspunkte auf dem Gewebe vollautomatisch bei 40× Vergrößerung. Die digitalisierten Schnitte im .svs Datenformat wurden auf ein NAS-Speichersystem transferiert. Die Auswertung aller Schnitte, einschließlich der Tumorbereich-Annotation und MZ-Zählung, erfolgte an einem Monitor (Wacom Cintiq 22HD) mit der Aperio ImageScope x64 Software (Leica Biosystems Pathology Imaging).

2.6 Histologische Auswertung

2.6.1 Klassifikation und Grading

Grading beschreibt die histologische Ermittlung des Tumorzelldifferenzierungs- und Invasivitätsgrades. Liegen divers differenzierte Areale innerhalb einer Läsion vor, so ist der höhere Grad entscheidend. Die diagnostische Klassifikation und das Grading muriner intestinaler Läsionen erfolgte gemäß der aktuellen toxikopathologischen INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice) Kriterien (NOLTE et al., 2016), ergänzt durch das aktuellste Konsensuspapier für Mausmodelle der intestinalen Karzinogenese, entworfen von einem internationalen Expertenkonsortium für Mausmodelle menschlicher Krebserkrankungen (Mouse Models of Human Cancer Consortium (MMHCC) (BOIVIN et al., 2003; WASHINGTON et al., 2013) (siehe Tabelle A25). Vor allem die zuletzt genannten Konsensusrichtlinien sollen eine möglichst nah am humanen Abbild orientierte, komparative Evaluation muriner intestinaler Läsionen in der biomedizinisch-onkologischen Forschung gewährleisten.

Tabelle A25 | Zusammenfassung der diagnostischen Kriterien muriner intestinaler neoplastischer Läsionen modifiziert nach Washington et al. (2013) und Nolte et al. (2016) (WASHINGTON et al., 2013; NOLTE et al., 2016).

Bezeichnung (Synonym)	Wachstumsmuster/Modifikation/Grading	Diagnostische Kriterien
Hyperplasie, Mukosa (Dysplasie, GIN (gastrointestinale intraepitheliale Neoplasie), frühe neoplastische Läsion, atypische Krypten, dysplastische Krypten, dysplastische Foci, <i>aberrant crypt foci</i>)	Avillös, atypisch, niedriggradig (low-grade) bzw. hochgradig (high-grade) dysplastisch, Becherzell-Hyperplasie	Keine veränderte Mukosa-Architektur, klar begrenzte Proliferation, innerhalb der physiologischen intestinalen Schleimhaut-Begrenzung, Basalmembran ist intakt, keine Kompression des angrenzenden Gewebes, keine zellulären oder nukleären Atypien
Adenom (Polyp, adenomatöser Polyp)	Polypös, papillär, sessil; low-grade bzw. high-grade	Exophytisches oder endophytisches Wachstum, das über die physiologische Schleimhaut-Begrenzung hinaus geht (nicht intra-epithelial), Kompression angrenzender Schleimhautareale, Basalmembran zwingend intakt, Villus-Verzweigung oder tubuläre Krypten-Proliferation, metaplastische Areale und fokale Mineralisation möglich, Anzeichen zellulärer Atypie (z.B. Basophilie, Polaritätsverlust, Hyperchromasie und pleomorphe Nuklei, nukleäre Stratifikation) möglich
Adenokarzinom (Karzinom)	Tubulär, solide, papillär, tubulös-papillär, muzinös, siegelringzellig, zystisch, skirrhös, gemischt, undifferenziert	Veränderte mukosale Architektur, invasives Wachstum durch die Lamina muscularis mucosae oder tiefer, mit oder ohne stromaler Reaktion (Desmoplasie), intra- oder extrazellulärer Mukus, keine Metaplasie oder Mineralisation, verschiedene Grade zellulärer Atypie, viele Mitosefiguren; evtl. Metastasierung in angrenzende Lymphknoten und Organe; evtl. (Lymph-)Gefäßeinbrüche

Das Grading humaner und feliner intestinaler Neoplasien erfolgte gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumoren des Kolons und Rektums (NAGTEGAAL et al., 2019) (siehe Tabelle A26).

Tabelle A26 | WHO-Grading humaner und feliner intestinaler Neoplasien modifiziert nach Nagtegaal et al. (2019) (NAGTEGAAL et al., 2019).

Bezeichnung	Diagnostische Kriterien
Adenom	
Low-grade Adenom	Milde Atypien der Gewebearchitektur und Kernmorphologie, Kernlagerung (erhaltene Polarität zur Basalmembran hin)
High-grade Adenom	Eng aneinander liegende Krypten, irreguläre Krypten, komplexe glanduläre (kribriforme) Architektur, irreguläre Krypten, Kryptnekrosen, zellulärer Polaritätsverlust die Basalmembran betreffend, auffällige Atypien der Kernmorphologie wie hochgradig vergrößerte Zellkerne mit prominenten Nukleoli, aufgelockertem Chromatin; oft atypische Mitosefiguren
Karzinom	
Low-grade Karzinom	≥ 50 % der glandulären Strukturen sind regelgerecht differenziert, gute bis moderate Tumordifferenzierung
High-grade Karzinom	< 50 % der glandulären Strukturen sind regelgerecht differenziert, schlechte Tumordifferenzierung

2.6.2 WHO-Subtypisierung humaner und feliner kolorektaler Karzinome

Humane Neoplasien wurden gemäß der aktuell gültigen humanen WHO-Klassifikation histologisch subtypisiert (NAGTEGAAL et al., 2019) (siehe Tabelle A27). Aufgrund der hohen morphologischen Kongruenz feliner intestinaler Neoplasien mit den humanen Läsionen, wurden dieselben morphologischen Kriterien auch für die feline Kohorte angewandt.

Tabelle A27 | Histologische WHO-Subtypisierung humaner und feliner intestinaler Karzinome modifiziert nach Nagtegaal et al. (2019) (NAGTEGAAL et al., 2019).

Histologischer WHO-Subtyp	Histomorphologische Merkmale
Adenokarzinom <i>not otherwise specified</i> (ANOS)	Bösartige epitheliale Tumore des intestinalen Drüsenepithels mit glandulärer Architektur
Serratiertes Adenokarzinom	Serratierte Epithelarchitektur, evtl. muzinöse Areale, niedriges Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis
Adenomatöses Adenokarzinom	Mehr als 50 % der invasiven Tumorareale mit villöser Epithelstruktur (low grade), wenig Desmoplasie
Muzinöses Adenokarzinom	Mehr als 50 % des Tumorareals besteht aus extrazellulärem Muzin, das maligne Zellen enthält
Medulläres Karzinom	Infiltration maligner Zellen mit vesikulären Kernen, auffälligen Nukleoli und reichlich eosinophi-

	lem Zytoplasma, gleichzeitig hochgradige Infiltration von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten
Mikropapilläres Adenokarzinom	Mehr als 5 % des Tumors mit kleinen, runden Tumorzell-Clustern und stromalen Zwischenräumen, ähnlich Gefäßstrukturen, typische Retraktionsartefakte
Siegelringzellkarzinom	Mehr als 50 % der Tumorzellen weisen intrazytoplasmatisches, den Zellkern verdrängendes Muzin auf
Adenosquamöses Karzinom	Weist Charakteristika eines Adeno- und Plattenepithelkarzinoms auf
Undifferenziertes Karzinom	Epitheliale Differenzierung, jedoch weitestgehend undifferenziertes Wachstum
Karzinom mit sarkomatoider Komponente	Teils undifferenziert, dyskohäsiv und mit sarkomatoider Komponente (spindelzellige/rhabdoide Differenzierung), myxoide Matrix

2.6.3 Semiquantitatives Mastzell-Scoring

Tabelle A28 | Semiquantitatives Scoring der interepithelialen und Lamina propria-assoziierten mukosalen Mastzellinfiltration innerhalb (prä-)neoplastischer Areale im Darm der Maus.

Score	Beschreibung
0	Keine positiven ieMMZ
1	Wenige positive ieMMZ (≤ 5 /HPF) innerhalb der Läsion*
2	Einige positive ieMMZ (≤ 10 /HPF), diffus innerhalb der Läsion*
3	Moderate Anzahl positiver ieMMZ (≤ 20 /HPF), diffus innerhalb der Läsion*
4	Erhöhte Anzahl positiver ieMMZ (≤ 30 /HPF), diffus oder fokal innerhalb der Läsion*
5	Hohe Anzahl positiver ieMMZ (> 30 /HPF), multifokale Cluster innerhalb der Läsion*

HPF: Haupt Gesichtsfeld (high-power field) (40 \times) (0,095 mm²); die Zellzählung erfolgte mit Aperio ImageScope x64 (Leica); * pro (prä-)neoplastischer Läsion wurde das Areal eines HPF (entsprechend eines „Hotspots“ mit höchster Dichte an ieMMZ) ausgezählt.

Tabelle A29 | Semiquantitatives Scoring der interepithelialen mukosalen Mastzellinfiltration innerhalb (prä-)neoplastischer Areale im Darm des Menschen und der Katze.

Score	Beschreibung
0	Keine positiven ieMMZ in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
1	Einzelne positive ieMMZ (≤ 5) in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion

2	Einige positive ieMMZ (≤ 10) in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
3	Moderate Anzahl positiver ieMMZ (≤ 20) in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
4	Erhöhte Anzahl positiver ieMMZ (≤ 30) in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
5	Hohe Anzahl positiver ieMMZ (> 30) in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
Die Zellzählung erfolgte mit Aperio ImageScope x64 (Leica); * Zehn $\times 20$ Gesichtsfelder, zufällig verteilt über das Areal der (prä-)neoplastischen Läsion, wurden evaluiert.	

Tabelle A30 | Semiquantitatives Scoring der intratumoralen stromalen Mastzellinfiltration innerhalb (prä-)neoplastischer Areale im Darm des Menschen und der Katze.

Score	Beschreibung
0	Keine positiven stromalen MZ in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
1	1-50 positive stromale MZ in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
2	51-100 positive stromale MZ in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
3	101-150 positive stromale MZ in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
4	151-200 positive stromale MZ in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
5	> 200 positive stromale MZ in zehn $\times 20$ Gesichtsfeldern* innerhalb der Läsion
Die Zellzählung erfolgte mit Aperio ImageScope x64 (Leica); * Zehn $\times 20$ Gesichtsfelder, zufällig verteilt über das Areal der (prä-)neoplastischen Läsion und identisch mit den evaluierten Arealen des ieMMZ-Scorings, wurden evaluiert.	

2.7 DNA-Extraktion, PCR und Sanger-Sequenzierung

Zunächst wurden für 11 Fälle mit immunhistochemisch nachgewiesener, nukleärer β -Catenin Translokation auf konsekutiven HE- und β -Catenin-IHC-Schnitten dementsprechend positive Karzinomareale mit einem Markerstift eingezeichnet. Der Tumorzellgehalt dieser Areale musste mind. 30 % betragen. Daneben wurde Normalgewebe (Wildtyp-DNA) eingezeichnet (Kontrolle). Von allen FFPE-Blöcken wurden je 6 bis 8 FFPE-Schnitte à 8 μm hergestellt (Microm HM355S, Leica). Diese wurden über Nacht im Wärmeschrank (60 °C) getrocknet.

Nach Trocknung und Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe wurden der HE-Annotation entsprechende Areale der 8 μm -FFPE-Schnitte unter Zuhilfenahme von Skalpellklingen makrodissektiert und in ein beschriftetes Eppendorf-Röhrchen

(1,5 ml) mit 180 µl Inkubationspuffer und 20 µl Proteinase K überführt. Das Röhrchen wurde anschließend kurz abzentrifugiert und über Nacht bei 70 °C im Heizschüttler (500 rpm) inkubiert. Am Folgetag wurde 400 µl Lysis-Puffer zu jeder Probe gegeben und die DNA mittels Maxwell® RSC Instrument und Maxwell® RSC Blood DNA Kit (Promega) aus dem FFPE-Gewebe extrahiert.

Danach wurde die fluorimetrische Konzentrationsbestimmung (ng/µl) der Nukleinsäuren mittels Qubit™ 1X dsDNA HS Assay am Qubit™ 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) vorgenommen. Die DNA wurde anschließend mit Nukleasefreiem H₂O auf ca. 10 ng/µl verdünnt.

Zur Amplifikation des feline *CTNNB1*-Gens Exon 2 wurde jeweils ca. 10 ng DNA mit einem Mastermix (nukleasefreies H₂O; Puffer; dNTPs; Primer-F [10 µM], Primer-R [10 µM] (Metabion International AG); AmpliTaq Gold Polymerase (Thermo Fisher Scientific)) für die PCR im Eppendorf Mastercycler® gradient eingesetzt (siehe Tabelle A31).

Tabelle A31 | Temperaturprofil *CTNNB1*-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Bemerkung
1	95	3:00	Aktivierung Polymerase Initialer Denaturierungsschritt
2	95	1:00	DNA-Denaturierung
3	60	1:00	Primer <i>Annealing</i>
4	72	1:00	Elongation zurück zu Schritt 2 (40 Zyklen)
5	72	5:00	End-Elongation

Die Probenamplifikation wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Amersham Imager 680 Detection System, General Electric Company Healthcare BioSciences). Für die Aufreinigung des PCR-Amplifikats wurden je 10 µl mit 14 µl ExoSAP (Mastermix aus 0,4 µl Exo I, 1,6 µl SAP und 12 µl nukleasefreiem Wasser) (New England Biolabs) im Eppendorf Mastercycler® gradient eingesetzt und verdaut (siehe Tabelle A32).

Tabelle A32 | Protokoll (ExoSAP) zur Aufreinigung der PCR-Produkte.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
1	37	30:00
2	85	15:00

Mit je 3 µl des aufgereinigten Amplifikats wurde nach Herstellung eines BigDye™ v1.1 Terminator Cycle Sequencing Reaction Mix (Thermo Fisher Scientific) (Primer-F oder Primer-R [5 µM]; 10 µl Endvolumen) eine BigDye™ Terminator Cycle Sequenzierungsreaktion (Cycle Sequencing/modifizierte Sanger-Sequenzierung) im Mastercycler® gradient unter folgenden Bedingungen durchgeführt (siehe Tabelle A33).

Tabelle A33 | Temperaturprofil BigDye™ Terminator Cycle Sequenzierungsreaktion.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Bemerkung
1	96	1:00	Initialer Denaturierungsschritt
2	96	0:10	25 Zyklen
3	50	0:05	
4	60	4:00	

Im Anschluss wurde die gesamte Probe mit einem ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit™ (Zymo Research) für die Sequenzanalyse aufgereinigt und in 20 µl H₂O eluiert.

Es wurden je 5 µl Amplifikat mit jeweils 15 µl HiDi™ Formamid für die Sequenzierung geladen. Die DNA-Sequenzierung erfolgte in einem Kapillarsequenzierer (AB/Hitachi Genetic Analyzer 3130, Thermo Fisher Scientific). Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte manuell.

3 Ergänzendes Material

3.1 Supplementary Material Publikation I

Ergänzende Grafiken (Abbildung A1-A2) sowie Tabellen und Daten zur felinen Kohorte sind für die Publikation:

Groll T, Schopf F, Denk D, Mogler C, Schwittlick U, Aupperle-Lellbach H, Sarker SRJ, Pfarr N, Weichert W, Matiasek K, Jesinghaus M, Steiger K. Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas. *Cancers* (Basel). 2021 Nov 25;13(23):5941. <https://doi.org/10.3390/cancers13235941>

veröffentlicht und online verfügbar bzw. als ZIP-Ordner herunterladbar:

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13235941/s1>

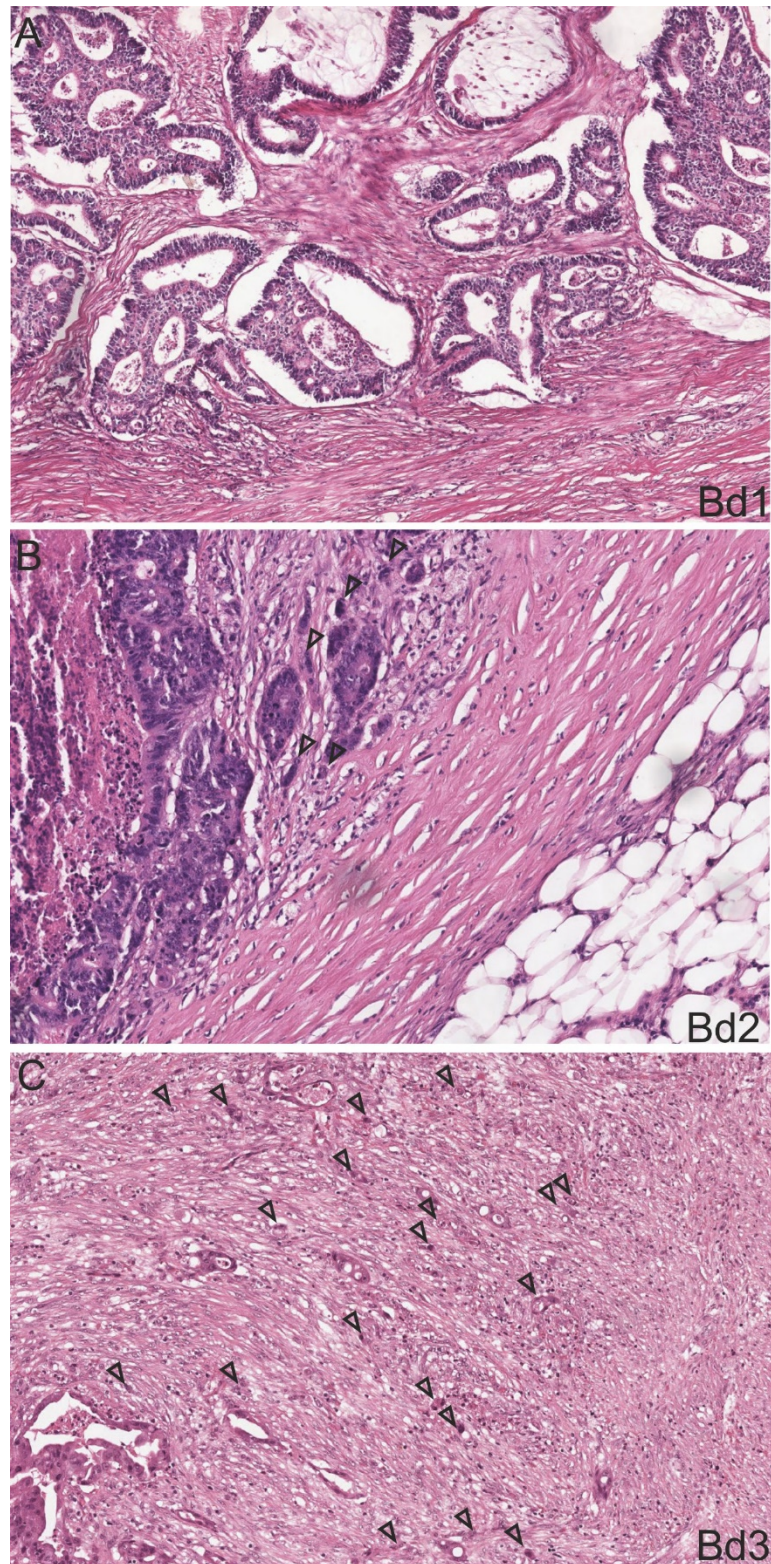


Abbildung A1 | Supplementary Figure S1. Tumor Budding (TB) in the invasive front of human CRC (HE; 20x). Tumor buds are indicated by arrow heads. (A) Low TB activity (Bd1); (B) Moderate TB activity (Bd2); (C) High TB activity (Bd3).

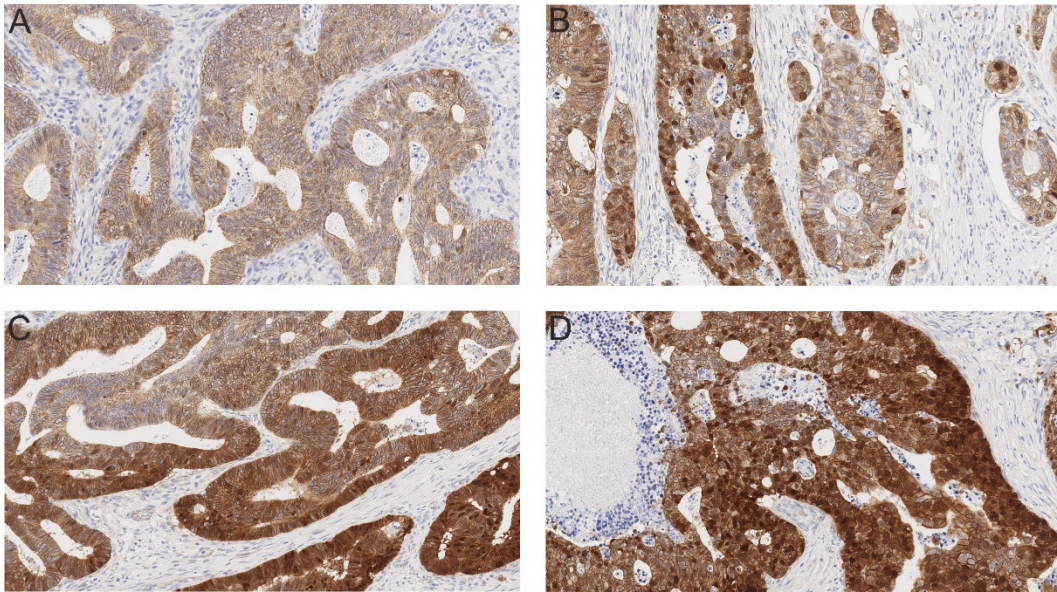


Abbildung A2 | Supplementary Figure S2. Corresponding human β -catenin phenotypes to Figure 2 (Anti- β -catenin; 20x). (A) Human colorectal tumor with no or scattered (< 5%) nuclear β -catenin staining; (B) 5-25% of tumor cells display nuclear positivity for β -catenin (score 1); (C) 26-50% of tumor cells display nuclear positivity (score 2); (D) > 50% of tumor cells are positive for nuclear β -catenin (score 3).

3.1.1 Graphical Abstract

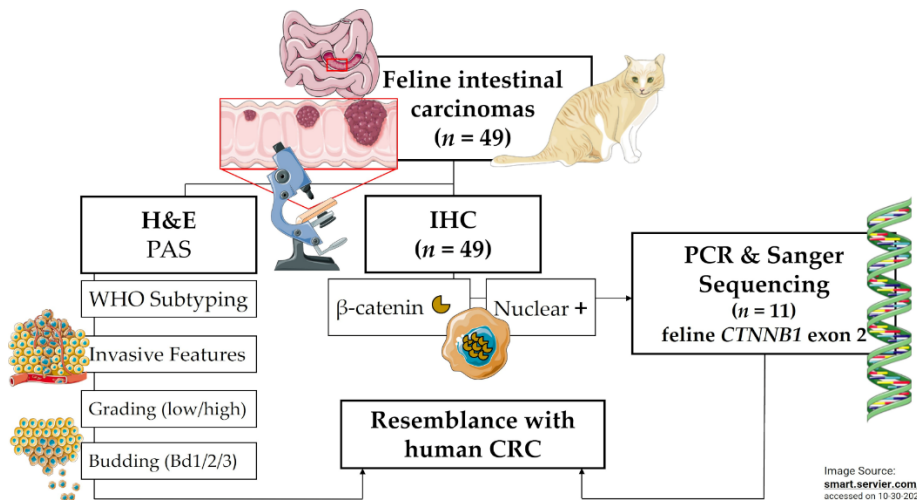


Abbildung A3 | Grafische Übersicht (*Graphical Abstract*) der Publikation “*Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas*”.

3.1.2 Cover Story *Cancers* Volume 13 Issue 23, December (I) 2021

Intestinal cancer is a common neoplastic disease in humans and cats. Mouse models are regarded as the gold standard in cancer research. However, malignancy features of human colorectal cancer (CRC), e.g., metastasis, tumor budding, are not easy to model. The study of Groll et al. reveals parallels of feline and human intestinal cancer on a histomorphological and molecular level, with special emphasis on WHO subtypes, tumor budding, and β -catenin expression. Feline intestinal neoplasms are histomorphologically close to the human counterpart. They display an intriguingly high tumor budding activity and comparable mutations of *CTNNB1*. This work indicates that cats constitute an immunocompetent and valuable *in vivo* model for human CRC. This is a first step toward the final idea of comparative oncology, which is to include pets with comparative cancer diseases in clinical trials (<https://www.mdpi.com/2072-6694/13/23>) (Abbildung A4).

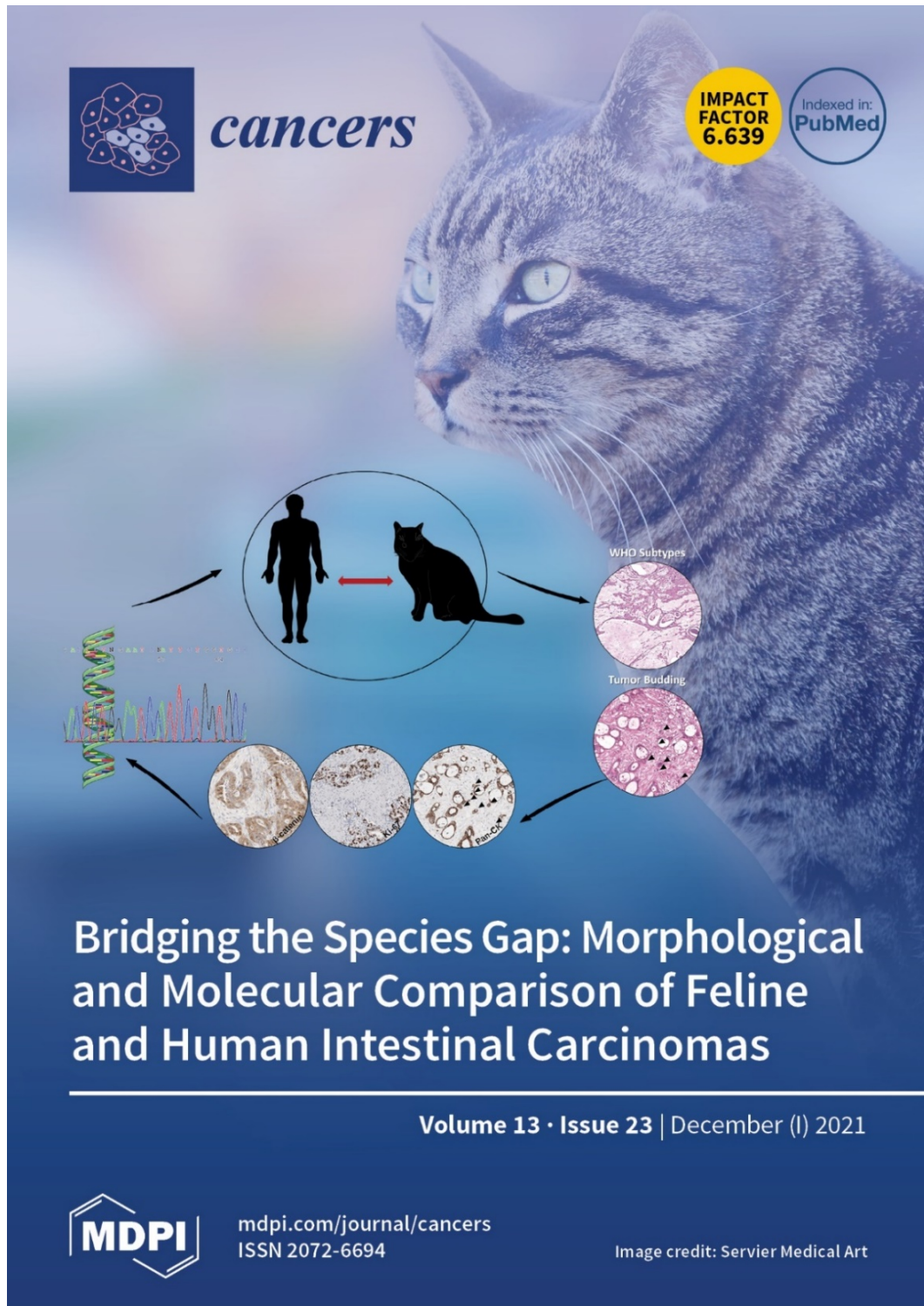


Abbildung A4 | Auswahl der eigenen Publikation als Cover Story des Journals *Cancers*, Volume 13, Issue 23, Dezember (I) 2021.

3.2 Supplementary Material Publikation II

Ergänzende Grafiken (Abbildungen A5-A13) sowie Tabellen und Daten sind für die Publikation:

Groll T, Silva M, Sarker RSJ, Tschurtschenthaler M, Schnalzger T, Mogler C, Denk D, Schölch S, Schraml BU, Ruland J, Rad R, Saur D, Weichert W, Jesinghaus M, Matiasek K, Steiger K. Comparative Study of the Role of Interepithelial Mucosal Mast Cells in the Context of Intestinal Adenoma-Carcinoma Progression. *Cancers* (Basel). 2022 Apr 30;14(9):2248. <https://doi.org/10.3390/cancers14092248> veröffentlicht und online verfügbar bzw. als ZIP-Ordner herunterladbar:

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14092248/s1>

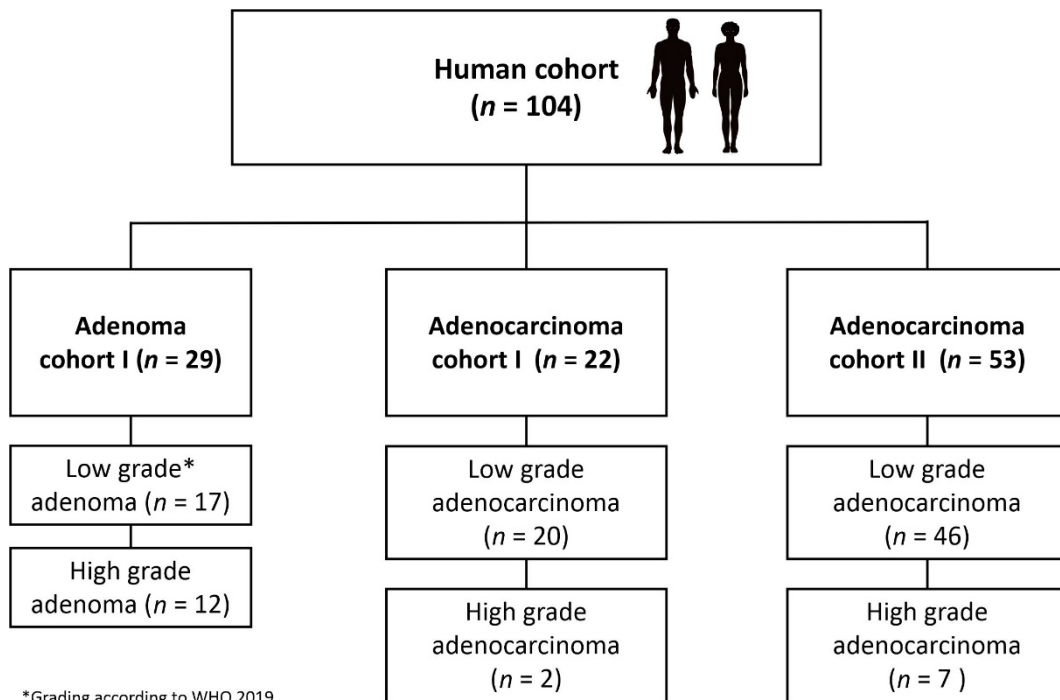


Abbildung A5 | Figure S1: Overview of the human cohort ($n = 104$). Cohort I of 17 low-grade and 12 high-grade adenomas and 22 adenocarcinomas was extended by adenocarcinoma cohort II ($n = 53$). Grading of adenomas and carcinomas (low-grade; high-grade) was accomplished according to the current human WHO classification.

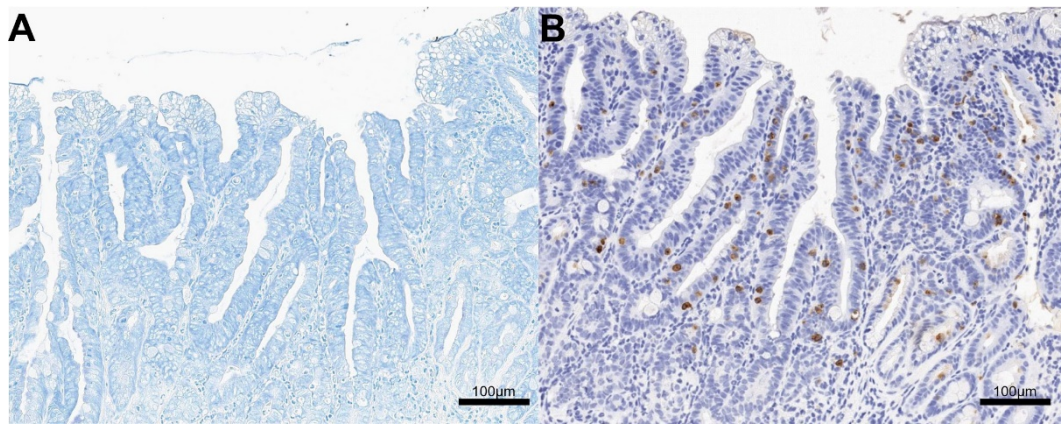


Abbildung A6 | Figure S2: A, B: Interepithelial mucosal mast cells (ieMMCs) in the intestinal mucosa of mice were not identifiable by metachromatic staining (toluidine blue). Serial sections for toluidine blue (A) and MCPT1 (B).

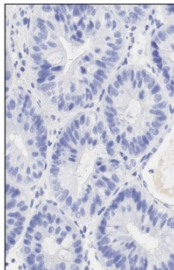
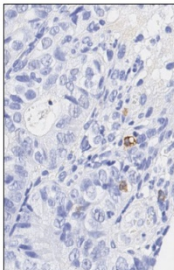
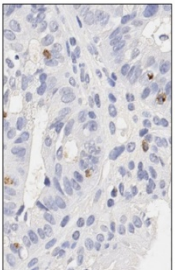
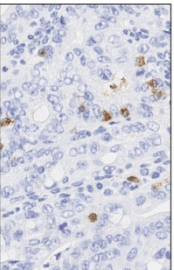
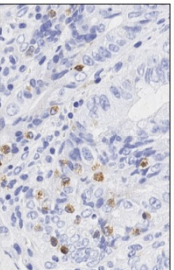
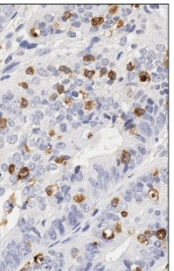
0	1	2	3	4	5
No positive mast cells (MCs) in the neoplastic area	Single positive MCs (≤ 5 /hpf) in the neoplastic area	Few diffuse positive MCs (≤ 10 /hpf) in the neoplastic area	Some diffuse positive MCs (≤ 20 /hpf) in the neoplastic area	Many diffuse, possibly clustered positive MCs (≤ 30 /hpf)	Many positive, significantly clustered MCs (> 30 /hpf)
					

Abbildung A7 | Figure S4: The employed semiquantitative score (0 to 5) for mucosal mast cells (ieMMCs and lpMMCs) in hotspots of murine intestinal lesions (hpf: high-power field, 40 \times).

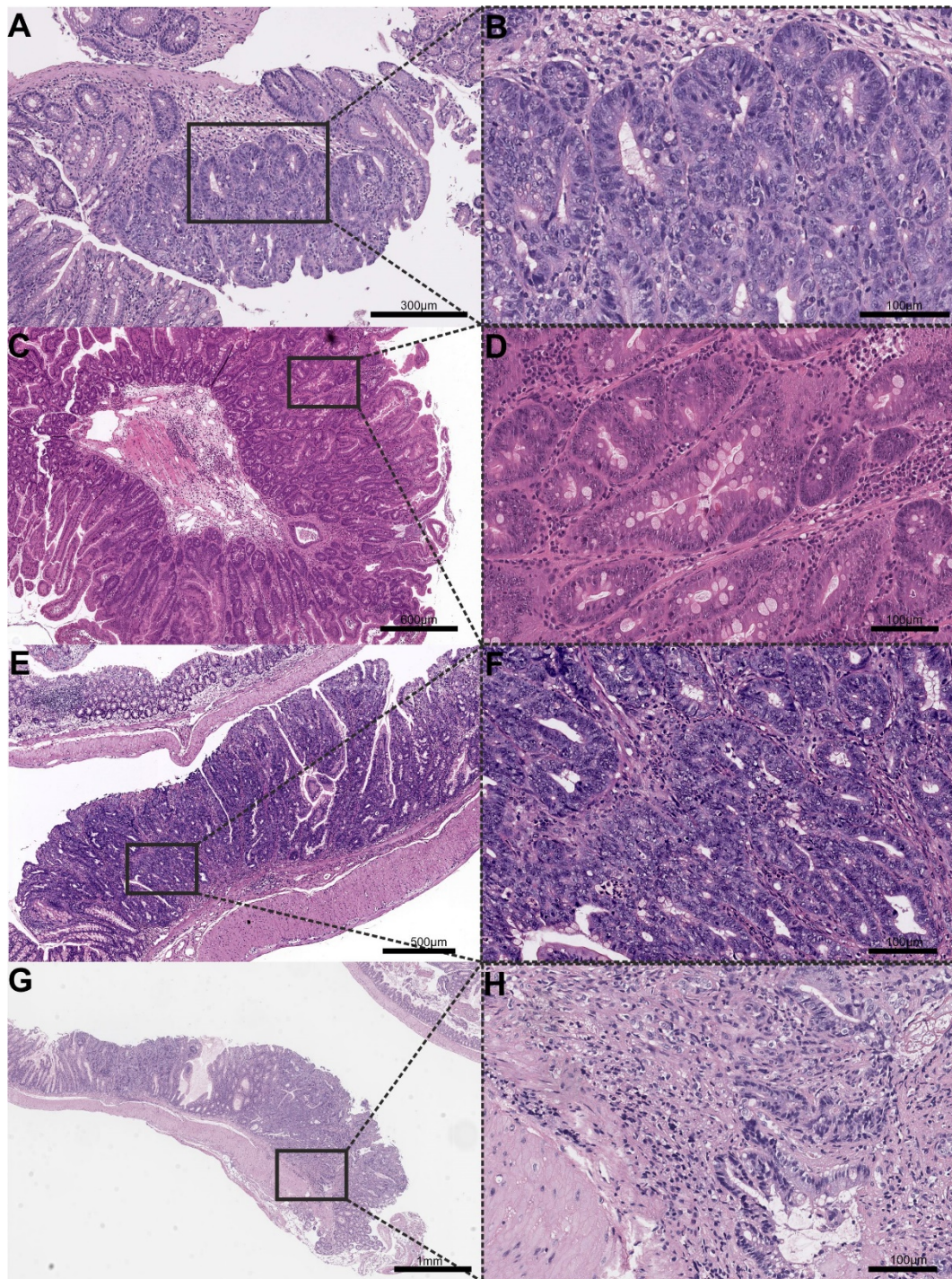


Abbildung A8 | Figure S3: Grading of murine lesions was performed according to Nolte et al., 2016 (NOLTE et al., 2016). A–H: Murine lesions were graded as atypical hyperplasia (A, B); low-grade adenoma (C, D); high-grade adenoma (E, F); or invasive carcinoma (G, H).

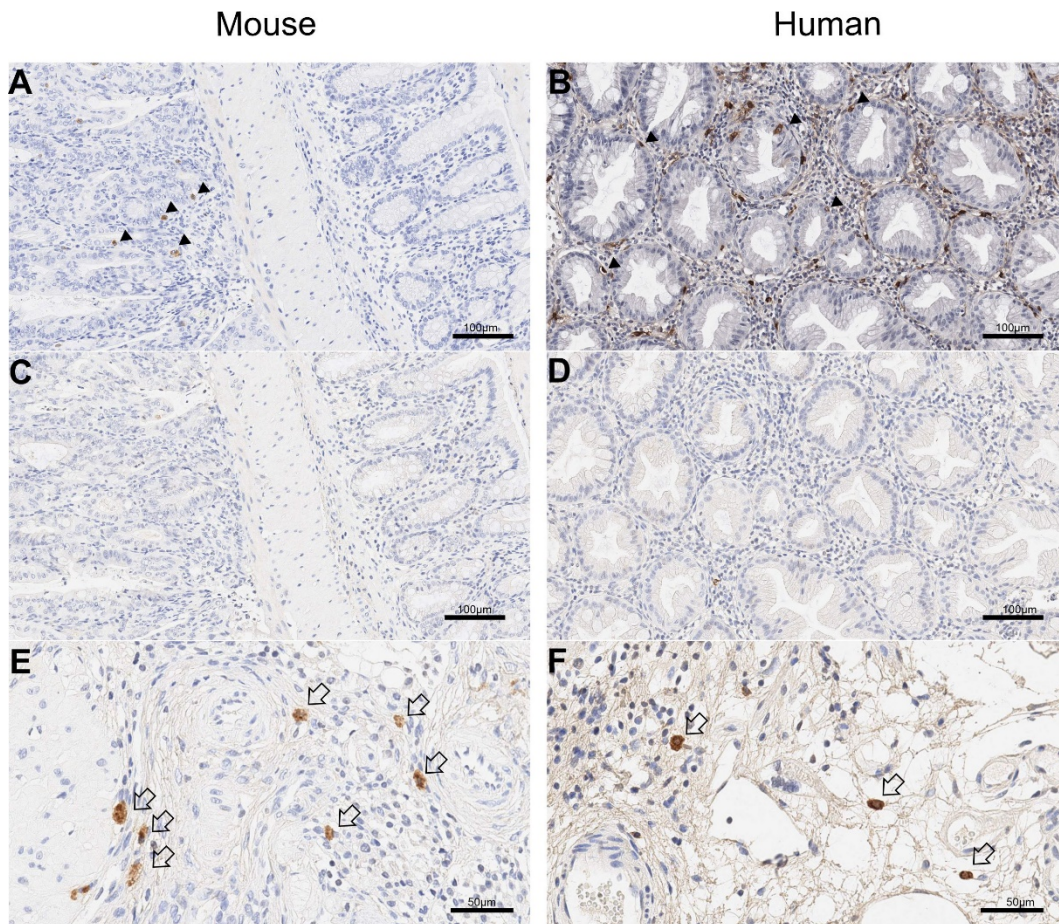


Abbildung A9 | Figure S5: A–F: IeMMCs (A, B) were negative for histamine (C, D), while connective tissue mast cells (CTMCs) of the intestine were positive for histamine (E, F). A,C: Murine high-grade adenoma with MPCT1+ ieMMCs (arrowheads) (A), which were negative for histamine in the serial section (C). B, D: Human low-grade sessile serrated adenoma with MCT+ ieMMCs (arrowheads) (B), which were negative for histamine in the serial section (D). E, F: CTMCs in the intestine of mice (E) and humans (F) were positive for histamine (arrows).

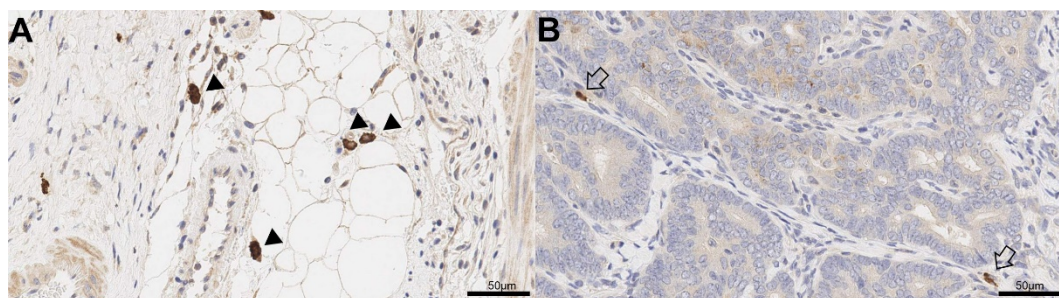


Abbildung A10 | Figure S6: A: Murine connective tissue mast cells (CMTCs) were MCPT6⁺ (MC Tryptase⁺) and appeared densely granulated and round (arrowheads). B: Lamina propria mucosal mast cells (lpMMCs, MCPT6⁺) of mice were generally slender and smaller than CMTCs (arrows).

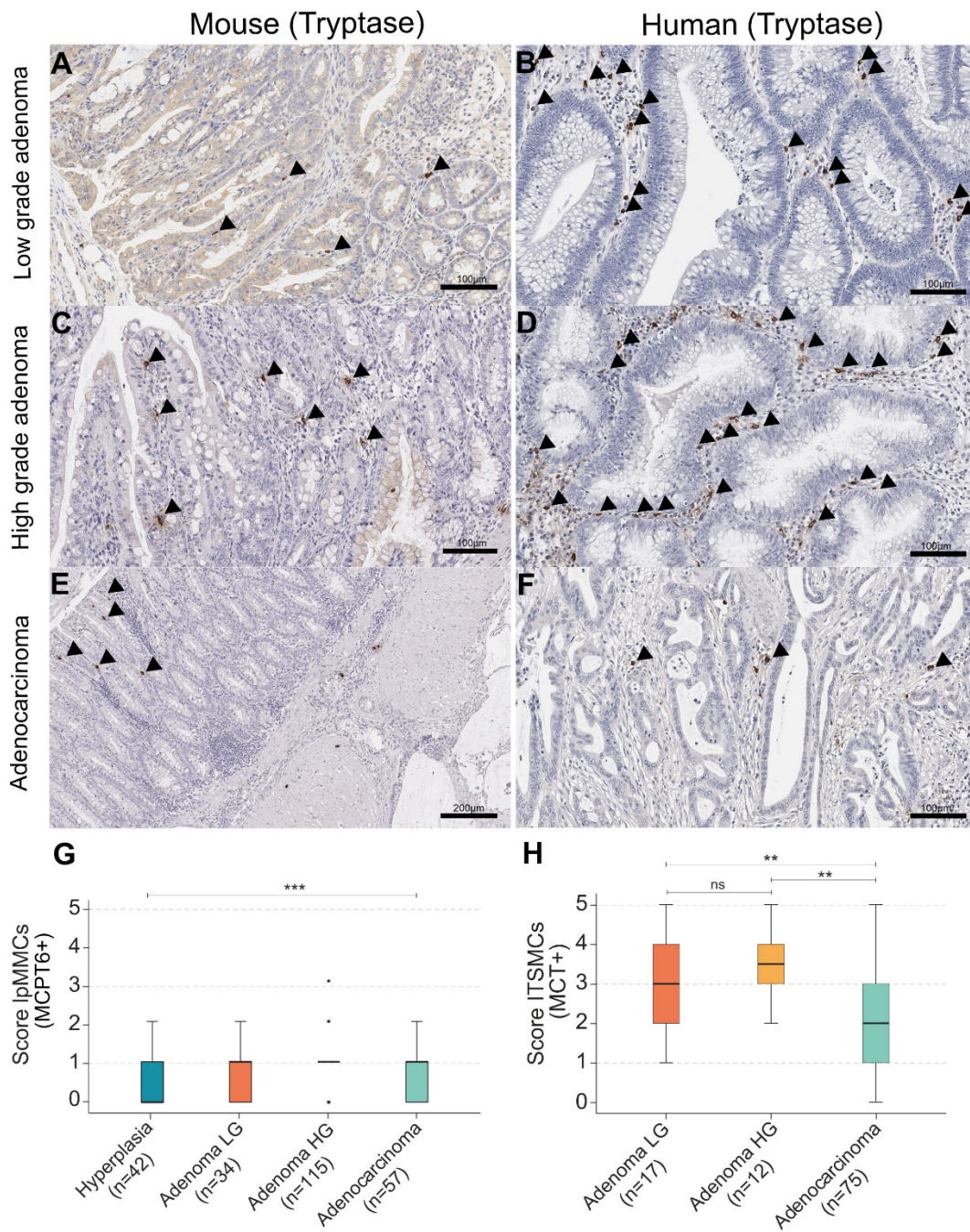


Abbildung A11 | Figure S7: A–F: LpMMCs in the adenoma-carcinoma sequence of mouse (A, C, E) and intratumoral stromal MCs (ITSMCs) in the human adenoma-carcinoma sequence (B, D, F). G: Scores of LpMMCs were lower in murine hyperplastic precursor lesions than in adenomas and carcinomas (Kruskal–Wallis test, $p = 0.001$). H: Contradictorily, stromal MC scores were higher in human precursor lesions than in carcinomas (Kruskal–Wallis test, $p < 0.001$).

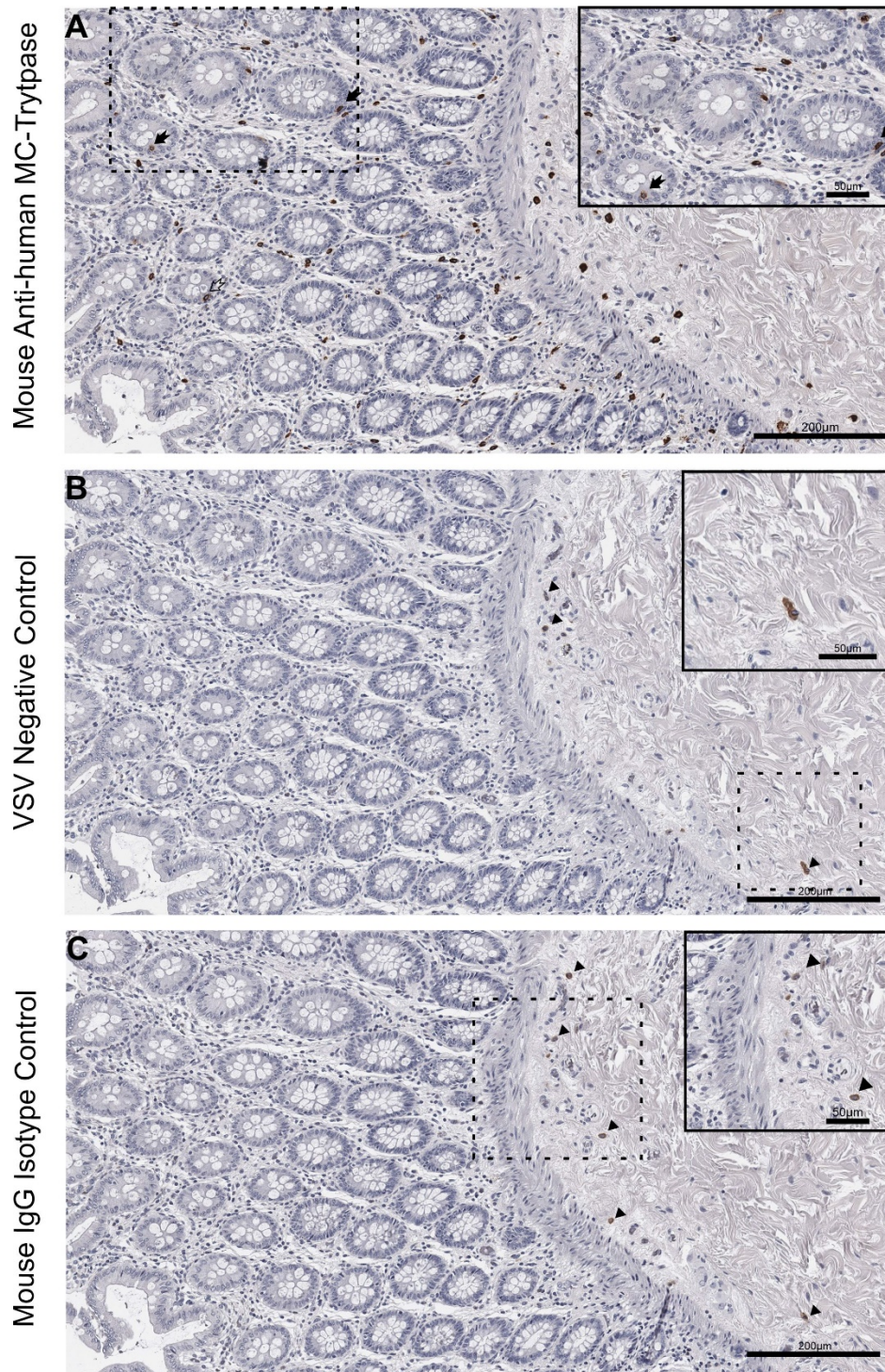


Abbildung A12 | Figure S8: A–C: Individual human stromal mast cells (ITSMCs) appeared to be nonspecifically positive due to heparin presence as previously described (SCHILTZ et al., 1993). MC tryptase-positive (MCT⁺) ieMMCs (arrows) (A) were negative in vesicular stomatitis virus (VSV)-IHC (B) and in mouse IgG isotype control (C), serving as negative IHC controls (serial sections). B, C: Connective tissue mast cells (CTMCs) (arrowheads) were occasionally positive in negative controls. Thus, MCT (A) was a specific marker for human intestinal ieMMCs.

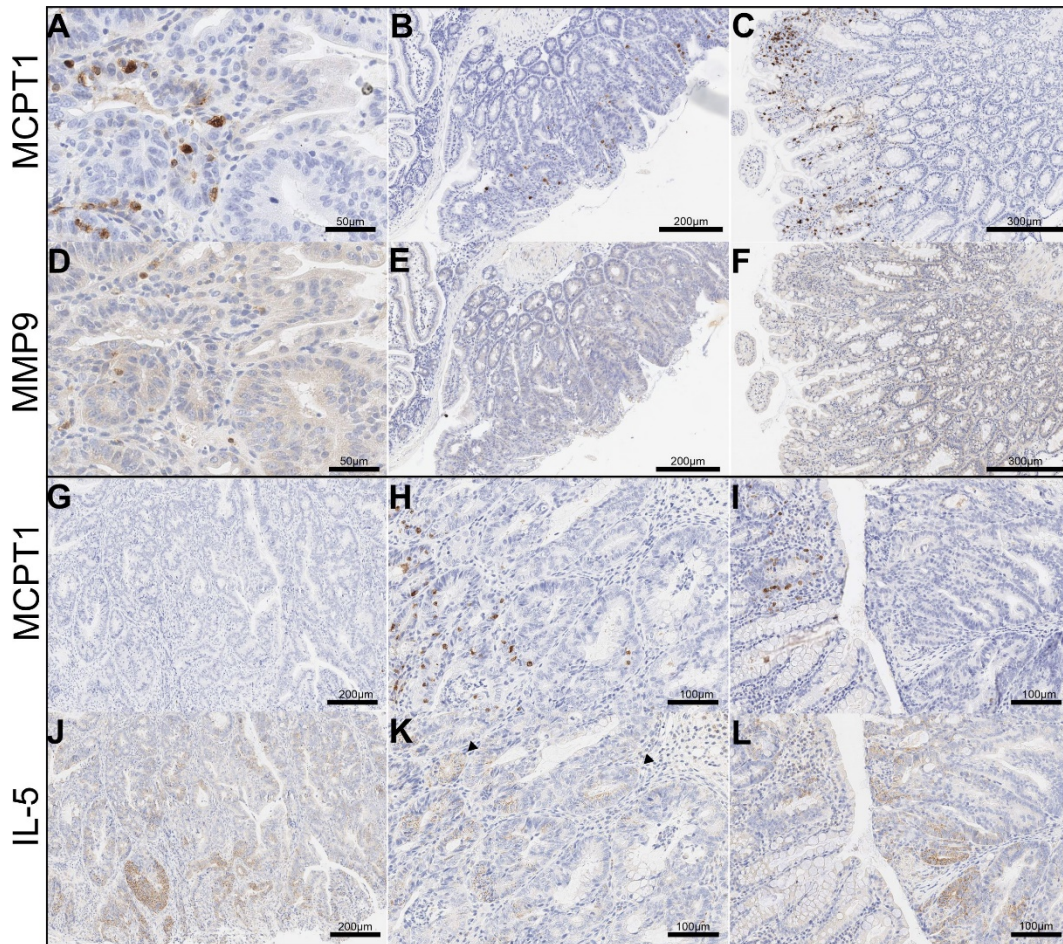


Abbildung A13 | Figure S9: A–F: MCPT1+ ieMMCs (A–C) were not coincident with MMP9+ cells (D–F) in serial sections of murine intestine. G–L: Absence (G) or presence of MCPT1+ ieMMCs in murine intestinal neoplasia. J–L: Luminal intestinal crypt cells were more often positive for IL-5 than basal crypt cells (J–L), but IL-5 positivity did not clearly correlate with ieMMC density (arrowheads).

XIV DANKSAGUNG

Am Ende meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei denjenigen Menschen bedanken, die mich durch die letzten Jahre hindurch begleitet und durch ihre Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

PD Dr. Katja Steiger gilt mein größter Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die Förderung und Betreuung meiner Dissertation. Durch Dich als Mentorin und dank Deiner Genialität, andauernden Unterstützung und Motivation war es mir möglich diese Arbeit erfolgreich zu beenden sowie meinen beruflichen Einstieg als Tierpathologin zu finden.

Professor Dr. Kaspar Matiasek danke ich sehr für die Möglichkeit, meine Dissertation als externe Doktorandin unter seiner Leitung am Institut für Tierpathologie der LMU anfertigen zu können, für die Unterstützung meiner Arbeit und das mir stets entgegengebrachte Vertrauen.

Der Bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk, Begabtenförderungswerk der katholischen Kirche in Deutschland, danke ich für die ideelle und finanzielle Förderung sowie geistliche Begleitung meiner Studien- und Promotionszeit, welche ohne das Cusanuswerk und viele Cusanerinnen und Cusaner nicht dieselbe gewesen wäre. Ich bin von Herzen dankbar, während meines Tiermedizinstudiums in die Förderung aufgenommen worden zu sein.

Meiner Mitstipendiatin Franziska Schopf danke ich für ihre Zeit bei uns und die damit verbundene Mitarbeit an der Etablierung der *CTNNTBI*-Sequenzierung an feinen Fibrosarkomen, welche wesentlich zum Gelingen der ersten Publikation beigetragen hat.

Professor Dr. Wilko Weichert und PD Dr. Carolin Mogler vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TUM gilt mein Dank für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Schnittstelle von Human- und Tierpathologie anfertigen zu können. Danken möchte ich auch Dipl. Biol. Nicole Pfarr (Molekulare Pathologie), Professor Dr. Moritz Jesinghaus und Dr. Marianne Reiser für den inspirierenden Austausch während der letzten Jahre.

Dem gesamten wunderbaren Team der CEP danke ich für die andauernde, großartige Unterstützung während dieser Arbeit, das geduldige Anlernen im Labor und

die von Beginn an herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Danke Anne, Annett, Ira, Marion, Olga, Petra, Ulrike (und Alumni Max, Sabrina)! Dem Tierärzteam Leona Arps, Dr. Simone Ballke und Thomas Metzler danke ich ebenso für die gegenseitige Unterstützung.

Dem Labor für klinische Diagnostik LABOKLIN, Bad Kissingen, insbesondere PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach und Dr. Ulrike Schwittlick, danke ich für die Bereitstellung der feline Karzinomkohorte und den wunderbaren wissenschaftlichen Austausch. Beides hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Daniela Denk und SYNLAB UK danke ich für die Bereitstellung feline intestinaler Adenome und die fachliche Unterstützung.

Mein großer Dank gilt ebenfalls allen kooperierenden Arbeitsgruppen am Translational Medicine Center (TUM), am BMC (LMU) und am DKFZ (Heidelberg) für die freundliche Zurverfügungstellung des intestinalen murinen FFPE-Gewebes.

Danken möchte ich an dieser Stelle Miguel Silva und Theresa Schnalzger für die hilfreiche und geduldige Beantwortung all meiner Fragen zu Mausmodellen.

Sophie Franzmeier, Margaret Tulessin und Juliana Gonçalves danke ich für die schöne gemeinsame Zeit am Institut für Pathologie der TUM sowie für ihre Unterstützung.

Danken möchte ich auch meinen Freunden: Eva, Hannah, Jan, Julia, Lena, Lorena, Maja, Nora, Sven.

Meinen Eltern Renate und Martin Groll gilt abschließend mein größter Dank. Ihr habt mir das Studium der Tiermedizin ermöglicht, mich immer bedingungslos unterstützt und mir in jeder Lebenslage den Rücken gestärkt. Ohne Euch wäre ich nicht so einfach wieder aufgestanden und hätte meine Ziele nicht erreicht. Danke.