

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungen	IX
1 EINLEITUNG	1
2 STAND DER FORSCHUNG UND LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 DAS MAIGNE LYMPHOM DES HUNDES	3
2.1.1 Vorkommen und Inzidenz	3
2.1.2 Stadieneinteilung	3
Anatomische Stadien	4
Klinische Stadien	4
2.1.3 Histomorphologische Klassifikation und Immunphänotypisierung	5
2.2 CHEMOTHERAPIE DES MALIGNEN LYMPHOMS	6
2.3 DIE BEDEUTUNG VON MDR1 UND MRP1	7
2.3.1 Charakterisierung von ATP-getriebenen Effluxtransportern	7
MDR1	7
MRP1	8
2.3.2 Polymorphismen im MDR1-Gen	8
Bedeutung von Polymorphismen in der Humanmedizin	8
MDR1-Genedefekt beim Hund	9
2.3.3 Polymorphismen im MRP1-Gen	12
2.4 THERAPIEVERSAGEN DURCH MEDIKAMENTENRESISTENZ	12
2.4.1 Verschiedene Mechanismen der Therapieresistenz	12
2.4.2 Therapieresistenz durch MDR1	14
2.5 KOMPLIKATIONEN DER CHEMOTHERAPIE	15
2.5.1 Myelosuppression	17
2.5.2 Gastrointestinale Toxizität	17
2.6 TYROSINKINASEINHIBITOREN	18
2.6.1 Charakterisierung des cKIT-Gens	18
2.6.2 Mutationen im cKIT-Gen	20
2.6.3 Tyrosinkinaseinhibitoren als neue Therapieoption in der Veterinär-onkologie	21
3 MATERIAL	23
3.1 MATERIALIEN FÜR DIE SEQUENZANALYSE	23
3.1.1 Primer für die Sequenzierung	23
MDR1	23
MRP1	24
cKIT	24
3.1.2 Polymerasen und kommerziell erhältliche Kits, sonstige Materialien	25
3.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	26
3.2.1 Native-Agarose-Gelelektrophorese für DNA	26
3.3 MATERIALIEN FÜR DIE QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	26
3.3.1 TaqMan Gene Expression Assays für die quantitative Real Time PCR	26
3.3.2 TaqMan Gene Expression Master Mix	27
3.3.3 Sonstiges Material	27
3.4 MATERIALIEN UND EDV-PROGRAMME ZUR STATISTISCHEN AUSWERTUNG	27
3.4.1 Material	27
3.4.2 EDV-Programme	29
3.4.3 Bioinformatische Datenbanken	29
3.5 CHEMISCHE SUBSTANZEN	30
3.6 GERÄTE	31

3.7	VERBRAUCHSMATERIAL	32
4	METHODEN	34
4.1	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
4.1.1	RNA-Konzentrationsbestimmung	34
4.1.2	DNase I	34
4.1.3	Native Agarose-Gelelektrophorese	35
4.1.4	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	35
4.1.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
4.2	PROBENACQUISITION, PROBENGEWINNUNG UND TUMORIDENTIFIZIERUNG	36
4.2.1	Acquisition von Blut- und Gewebeproben	36
4.2.2	Bestimmung von Lymphoblasten im Blutausstrich	37
4.2.3	Feinnadelaspiration und Tumoridentifizierung	39
4.2.4	Entnahme einer TruCut- oder Stanzbiopsie	41
4.3	METHODEN ZUR ISOLIERUNG UND AUFARBEITUNG VON RNA	42
4.3.1	Total-RNA Isolierung aus Blut	42
4.3.2	Total-RNA Isolierung aus Gewebe	43
4.3.3	cDNA Synthese aus Total-RNA	44
4.4	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	44
4.4.1	Allgemeines zur Primerauswahl	44
4.4.2	PCR-Reaktionsansatz	45
4.4.3	Touchdown-PCR	46
4.4.4	Quantitative Real-Time PCR	47
4.5	SEQUENZIERUNG UND AUSWERTUNG DER SEQUENZSPUREN	48
4.6	BEWERTUNG VON AMINOSÄURESUBSTITUTIONEN MIT DEN PROGRAMMEN POLYPHEN UND SIFT	48
4.6.1	Bewertung nach PolyPhen	48
4.6.2	Bewertung nach SIFT	49
5	ERGEBNISSE	51
5.1	ALLGEMEINE PATIENTENCHARAKTERISTIKA	51
5.1.1	Identifizierung von Polymorphismen in den MDR1- und MRP1-Genen sowie Evaluierung einer MDR1-vermittelten Therapieresistenz	51
5.1.2	Identifizierung von Polymorphismen und „Gain-of-function“ Mutationen im cKIT Gen	55
5.2	SEQUENZANALYSE MDR1	56
5.2.1	MDR1 Primer und ihre Lokalisation	56
5.2.2	Polymorphismen im caninen MDR1-Gen	57
5.3	MDR1-EXPRESSIONSNIVEAU BEI HUNDEN MIT NEBENWIRKUNGEN	62
5.4	THERAPIERESISTENZ DURCH MDR1 BEIM CANINEN LYMPHOMPATIENTEN	65
5.4.1	Sensitivität der verwendeten Assays	65
5.4.2	Entwicklung einer Therapieresistenz bei 15 Patienten (Teilstudie III)	66
5.5	SEQUENZANALYSE MRP1	70
5.5.1	MRP1 Primer und Lokalisation	70
5.5.2	Polymorphismen im caninen MRP1-Gen	71
5.6	EVALUIERUNG VON NEBENWIRKUNGEN BEIM CANINEN LYMPHOMPATIENTEN	75
5.7	SEQUENZANALYSE cKIT	82
5.7.1	cKIT Primer und Lokalisation	82
5.7.2	Polymorphismen und Mutationen im cKIT-Gen	83
6	DISKUSSION	90
6.1	CHEMOTHERAPIE UND IHRE NEBENWIRKUNGEN	90
6.2	INDIVIDUALISIERTE THERAPIE?	96

6.2.1	Genetische Varianten nehmen Einfluss auf die Therapie	97
6.2.2	MDR1-Expressionsniveau als Ursache für die Therapieunverträglichkeit	100
6.2.3	Chemotherapie: Resistenz und Wirkungsverlust	104
6.3	ZIELGERICHTETE KREBSTHERAPIE.....	106
7	ZUSAMMENFASSUNG	110
8	SUMMARY.....	112
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
10	ANHANG	130
11	DANKSAGUNGEN.....	135
12	ERKLÄRUNG.....	137