

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	- 1 -
2	LITERATURÜBERSICHT	- 3 -
2.1	Das canine Gesäuge	- 3 -
2.1.1	Anatomie und Histologie	- 3 -
2.1.2	Ontogenese der caninen Milchdrüse	- 5 -
2.2	Canine Mammatumore	- 6 -
2.2.1	Epidemiologie	- 6 -
2.2.2	Ätiologie	- 7 -
2.2.3	Klassifikation	- 9 -
2.2.3.1	Epitheliale Tumore	- 9 -
2.2.3.2	Mesenchymale Tumore und Karzinosarkome	- 10 -
2.3	Transforming Growth factor-Beta (TGF-beta)	- 11 -
2.3.1	Einleitung	- 11 -
2.3.2	TGF-beta-Proteinstruktur	- 11 -
2.3.3	TGF-beta-Aktivierung	- 12 -
2.3.4	TGF-beta-Signaltransduktionskaskade	- 14 -
2.3.5	TGF-beta-biologische Funktion	- 15 -
2.3.5.1	Biologische Funktion von TGF-beta in der Milchdrüse	- 16 -
2.3.5.2	Biologische Funktion von TGF-beta in der Karzinogenese epithelialer Neoplasien	- 17 -
2.4	Latent TGF-beta Binding Protein (LTBP)	- 18 -
2.4.1	Einleitung	- 18 -
2.4.2	LTBP-Proteinstruktur	- 18 -
2.4.3	LTBP in der TGF-beta-Aktivierung und -Signaltransduktion	- 20 -
2.4.4	Bindungsaffinität der LTBP-Isoformen an den TGF-beta-Isoformen	- 21 -
2.4.5	LTBP-Interaktionen mit der Matrix	- 21 -
2.4.6	LTBP-biologische Funktion	- 22 -
2.4.6.1	Biologische Funktion von LTBP in der Karzinogenese epithelialer Neoplasien	- 24 -

3	MATERIAL UND METHODEN	- 25 -
3.1	Patientenkollektiv-PROBENMATERIAL	- 25 -
3.2	FRAGEBOGEN FÜR DEN TIERHALTER	- 26 -
3.3	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	- 27 -
3.3.1	Probenaufbereitung	- 27 -
3.3.2	Histopathologische Beurteilung	- 28 -
3.3.2.1	Ausschnitt aus den WHO-Richtlinien zur Klassifizierung von caninen Mammatumoren	- 28 -
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	- 29 -
3.4.1	Übersicht	- 29 -
3.4.2	RNA-Isolierung	- 30 -
3.4.2.1	Stabilisierung von Proben-RNA	- 30 -
3.4.2.2	Isolierung der Gesamt-RNA aus stabilisierten Proben	- 30 -
3.4.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	- 31 -
3.4.4	Bestimmung der RNA-Integrität	- 31 -
3.4.4.1	Allgemeines	- 31 -
3.4.4.2	Durchführung	- 32 -
3.4.4.3	RNA Integrity Number (RIN)	- 32 -
3.4.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	- 33 -
3.4.6	Quantitative PCR (qPCR)	- 34 -
3.4.6.1	Überblick	- 34 -
3.4.6.2	Protokoll der qPCR	- 35 -
3.4.6.3	Qualitativer Nachweis von Targetgenen	- 37 -
3.4.6.3.1	Übersicht	- 37 -
3.4.6.4	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonukleotide (Primer) für die qPCR	- 37 -
3.4.6.4.1	Aufreinigung eines PCR-Produktes	- 39 -
3.4.6.4.2	Sequenzierung	- 39 -
3.4.6.5	Relative Quantifizierung	- 39 -
3.4.6.5.1	QPCR Assay-Etablierung	- 39 -
3.4.6.5.2	Bestimmung der C _T -Werte (cycle threshold values)	- 41 -
3.4.6.5.3	Auswertung der Schmelzkurvenanalyse	- 41 -
3.4.6.5.4	Bestimmung der relativen Expression	- 42 -
3.4.6.5.5	Referenzgene (housekeeping genes)	- 43 -
3.4.6.5.5.1	Übersicht	- 43 -

3.4.6.5.5.2	Bestimmung geeigneter Referenzgene	- 43 -
3.4.6.5.6	QPCR-Kontrollen	- 45 -
3.5	Darstellung der Ergebnisse und Statistische Auswertung	- 46 -
4	ERGEBNISSE	- 48 -
4.1	Patientenkollektiv	- 48 -
4.2	Auswertung des Fragebogens und der Klinikhistorie	- 48 -
4.2.1	Allgemeines	- 48 -
4.2.2	Rasse	- 48 -
4.2.3	Alter	- 49 -
4.2.4	Kastrationsstatus	- 50 -
4.2.5	Lokalisation der Mammatumore	- 50 -
4.3	Lichtmikroskopische Untersuchung der Hämatoxilin-Eosin (HE)- Färbungen	- 51 -
4.3.1	Gruppe der simplen Karzinome	- 52 -
4.3.1.1	Hochmaligne simple Karzinome	- 53 -
4.3.2	Gruppe der komplexen Karzinome	- 54 -
4.3.3	Gruppe der Adenome	- 55 -
4.4	Molekularbiologische Methoden	- 56 -
4.4.1	RNA-Konzentration und RNA-Integrität	- 56 -
4.4.1.1	RNA-Konzentration	- 56 -
4.4.1.2	RNA-Integrität	- 56 -
4.4.2	Quantitative PCR (qPCR)	- 56 -
4.4.2.1	Qualitativer Nachweis von Targetgenen	- 56 -
4.4.2.1.1	Primerherstellung von TGF-beta1, 2, 3 und LTBP-1, -3 und -4	- 56 -
4.4.2.1.2	Sequenzierungsergebnisse	- 57 -
4.4.2.2	Relative Quantifizierung	- 60 -
4.4.2.2.1	QPCR Assay-Etablierung	- 60 -
4.4.2.2.1.1	TGF-beta1	- 60 -
4.4.2.2.1.2	TGF-beta2	- 61 -
4.4.2.2.1.3	TGF-beta3	- 61 -
4.4.2.2.1.4	LTBP-1	- 62 -
4.4.2.2.1.5	LTBP-3	- 62 -
4.4.2.2.1.6	LTBP-4	- 63 -
4.4.2.3	Bestimmung der C _T -Werte	- 63 -

4.4.2.4	Referenzgene	- 63 -
4.4.2.5	QPCR-Kontrollen	- 64 -
4.4.2.6	Relative Expression	- 64 -
4.4.2.6.1	Allgemeines	- 64 -
4.4.2.6.2	Relative Expression der Referenzgene	- 64 -
4.4.2.6.3	Ausschluss der Hautproben als Kontrollgewebe	- 65 -
4.4.2.6.4	Relative Expression der einzelnen GOIs	- 67 -
4.4.2.6.4.1	Einleitung	- 67 -
4.4.2.6.4.2	TGF-beta1	- 67 -
4.4.2.6.4.3	TGF-beta2	- 68 -
4.4.2.6.4.4	TGF-beta3	- 69 -
4.4.2.6.4.5	LTBP-1	- 70 -
4.4.2.6.4.6	LTBP-3	- 71 -
4.4.2.6.4.7	LTBP-4	- 73 -
4.4.2.6.5	Relative Expression der GOIs im Gruppenvergleich	- 74 -
4.4.2.6.6	Korrelation der Genexpression der GOIs	- 75 -
4.4.2.6.6.1	Einleitung	- 75 -
4.4.2.6.6.2	Korrelation der relativen Expression der GOIs in simplen Karzinomen und komplexen Karzinomen	- 76 -
4.4.2.6.6.3	Korrelation der relativen Expression der GOIs in hochmalignen simplen Karzinomen und Adenomen	- 80 -
4.4.2.6.7	Relative Expression der GOIs bei primärer Multiplizität	- 81 -
5	DISKUSSION	- 83 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 98 -
7	SUMMARY	- 100 -
8	LITERATURVERZEICHNIS	- 102 -
9	ANHANG	- 114 -
9.1	MATERIAL UND METHODEN	- 114 -
9.1.1	Adressen der Kooperationspartner	- 114 -
9.1.2	Fragebogenlayout	- 114 -
9.1.3	Histologische Untersuchung	- 115 -
9.1.3.1	Herstellung der Mayer Hämalaun Lösung	- 115 -
9.1.3.2	Verwendete Chemikalien	- 115 -

9.1.4	Histologische Beurteilung	- 116 -
9.1.4.1	Verwendete Internetseiten	- 116 -
9.1.5	Molekularbiologische Methoden	- 116 -
9.1.5.1	Stabilisierung von Proben-RNA	- 116 -
9.1.5.1.1	Verwendete Chemikalien	- 116 -
9.1.5.2	Isolierung der Gesamt-RNA aus stabilisierten Proben	- 116 -
9.1.5.2.1	Verwendete Chemikalien	- 116 -
9.1.5.2.2	Verwendete Utensilien	- 116 -
9.1.5.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	- 116 -
9.1.5.3.1	Verwendete Utensilien	- 116 -
9.1.5.4	Bestimmung der RNA-Integrität	- 117 -
9.1.5.4.1	Verwendete Chemikalien	- 117 -
9.1.5.4.2	Verwendete Utensilien	- 117 -
9.1.5.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	- 117 -
9.1.5.5.1	Verwendete Chemikalien	- 117 -
9.1.5.5.2	Verwendete Utensilien	- 117 -
9.1.5.6	Quantitative PCR	- 117 -
9.1.5.6.1	Verwendete Chemikalien	- 117 -
9.1.5.6.2	Verwendete Utensilien	- 117 -
9.1.5.7	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonukleotide (Primer) für die qPCR	- 118 -
9.1.5.7.1	Software	- 118 -
9.1.5.7.2	Primerhersteller	- 118 -
9.1.5.8	Aufreinigen eines PCR-Produktes	- 118 -
9.1.5.8.1	Verwendete Chemikalien	- 118 -
9.1.5.9	Sequenzierung	- 118 -
9.1.5.10	Weitere Utensilien und Geräte	- 118 -
9.2	Ergebnisse	- 119 -
9.2.1	Molekularbiologische Methoden	- 119 -
9.2.1.1	RNA-Integrität	- 119 -
9.2.2	Quantitative PCR (qPCR)	- 121 -
9.2.2.1	C _T -Werte der Referenzgene (ATP5B, HPRT und RPL32) und der GOIs (TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3 und LTBP-1, LTBP-3 sowie LTBP-4)	- 121 -
9.2.2.1.1	C _T -Werte in simplen Karzinomen und entsprechendem Kontrollgewebe	- 121 -
9.2.2.1.2	C _T -Werte in komplexen Karzinomen und entsprechendem Kontrollgewebe	- 123 -
9.2.2.1.3	C _T -Werte in Adenomen und entsprechendem Kontrollgewebe	- 123 -
9.2.2.2	Relative Expression der Referenzgene	- 124 -

9.2.2.3	Ausschluss Haut als Kontrollgewebe	- 125 -
9.2.2.4	FC-Werte der GOIs	- 126 -
9.2.2.5	Relative Expression der GOIs im Gruppenvergleich	- 127 -
9.2.2.5.1	Korrelation der Genexpression der GOIs	- 130 -
PUBLIZIERTE ERGEBNISSE		- 138 -
DANKSAGUNG		- 139 -