

4 ERGEBNISSE

4.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Von 40 Hündinnen wurden insgesamt 70 Tumore in die Voruntersuchungen einbezogen. Die Hündinnen wurden zwischen Juni 2005 und April 2006 wegen solitärer bzw. multipler Umfangsvermehrungen im Bereich der Gesäugeleiste vorgestellt und indikationsgemäß einer Partial- oder Totalmammektomie unterzogen. Nach Probenentnahme (siehe 3.1) und pathohistologischer Klassifikation der Umfangsvermehrungen nach WHO (siehe 3.3.2) konnten 45 Mammatumore von 31 der 40 Hündinnen in weiterführende Untersuchungen eingehen. Von einigen Tieren wurden aus einer Mammaleiste teilweise unterschiedlich pathohistologisch klassifizierte Tumorproben entnommen (siehe 3.1, Tabelle 1).

4.2 AUSWERTUNG DES FRAGEBOGENS UND DER KLINIKHISTORIE

4.2.1 Allgemeines

Die Auswertung der Klinikhistorie bzw. des Fragebogens über die Individuen erfolgte anhand einer deskriptiven Analyse der Häufigkeitsverteilung bezogen auf die unterschiedlichen Variablen (Rasse, Alter etc.). Die absoluten Häufigkeiten wurden mit Hilfe des Programms »SPSS 12.0 für Windows« und »Microsoft Office Excel 2003« durch einfache Balken- und Tortendiagramme oder als Tabelle dargestellt.

4.2.2 Rasse

In absoluten Zahlen waren am häufigsten Mischlingshunde ($n = 13$), gefolgt von Terriern ($n = 4$), Dackeln ($n = 4$) und Pudeln ($n = 3$) von Mammatumoren betroffen. Mit geringen Fallzahlen folgten Chihuahua ($n = 1$), Mittelschnauzer ($n = 1$), Bernersennenhund ($n = 1$), Cocker-Spaniel ($n = 1$), Golden Retriever ($n = 1$), Labrador ($n = 1$) und Epagneul Breton ($n = 1$). Die prozentuale Verteilung der an Mammatumor(en) erkrankten Hunderassen bezogen auf das in der Arbeit eingegangene Gesamtpatientengut ($n = 31$) kann der Abbildung 12 entnommen werden.

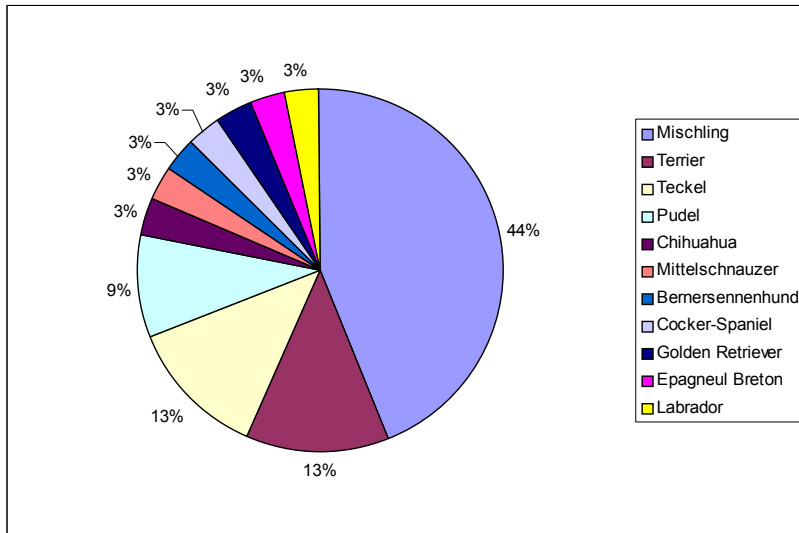


Abbildung 12 Prozentualer Anteil verschiedener Hunderassen (n = 11) mit Mammatumoren

4.2.3 Alter

Diagramm A stellt die Altersverteilung der 31 Hündinnen zum Zeitpunkt der Mastektomie dar. Die jüngste Hündin war 7 Jahre, die älteste 12 Jahre alt. Mit zunehmendem Alter stieg die Zahl der erkrankten Hündinnen an; das Maximum erkrankter Tiere lag bei neun Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 9,5 Jahre.

Diagramm B zeigt die Altersverteilung der 31 Hündinnen aufgeschlüsselt nach Altersgruppen (1. Gruppe < 7 Jahre (grün), 2. Gruppe = 7 aber < 10 Jahre (blau) und 3. Gruppe ≥ 10 Jahre (rot)) und Größe (kleine, mittelgroße und große Hunderassen). Der Darstellung ist zu entnehmen, dass kein Patient unter 7 Jahre alt war. Insgesamt lag das Alter von 18 Hunden zum Zeitpunkt der Operation zwischen 7 und 10 Jahren. 13 Hunde waren mindestens 10 Jahre oder älter. Des Weiteren verdeutlicht das Diagramm B, dass kleinwüchsige Hunderassen im Untersuchungszeitraum (siehe 4.1) weit häufiger von Mammatumoren betroffen waren als mittelgroße und große Rassen.

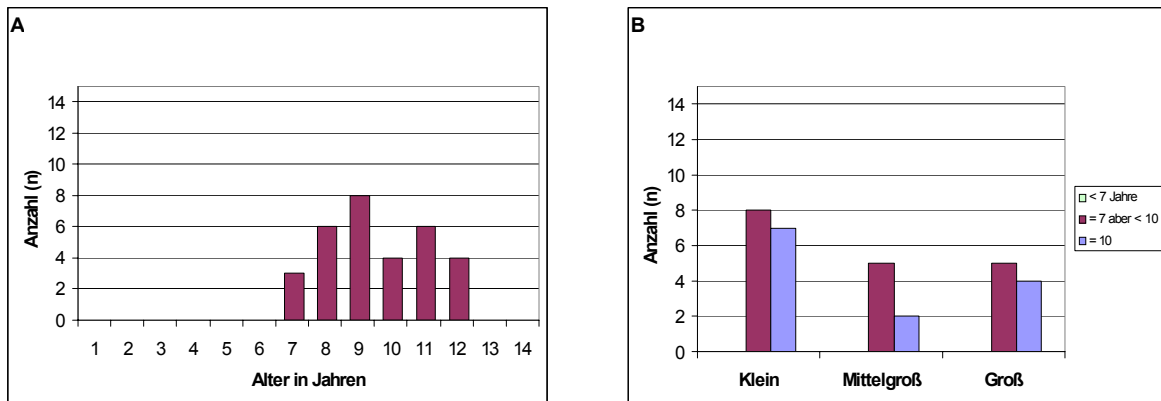


Abbildung 13 Diagramm A: Altersverteilung der Hündinnen (n = 31) mit Mammatumor(en). Diagramm B: Altersgruppen- und Größenverteilung von Hündinnen mit Mammatumoren (n = 31)

4.2.4 Kastrationsstatus

Zum Zeitpunkt der Mastektomie waren von 31 Hündinnen drei (9,7 %) bereits kastriert. Das Alter der Tiere zum Kastrationszeitpunkt lag zwischen 6 und 8 Jahren. Die 28 (90,3 %) nichtkastrierten Hündinnen (siehe Tabelle 11) wurden entweder intra operationem oder innerhalb des Kontrollzeitraumes (innerhalb sechs Wochen) nach der Mastektomie kastriert.

Tabelle 11 Häufigkeitsverteilung von kastrierten und nichtkastrierten Hündinnen

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Ja (Alter?)	1	3,2	3,2	3,2
	Ja (mit 6 Jahren)	1	3,2	3,2	6,5
	Ja (mit 8 Jahren)	1	3,2	3,2	9,7
	Nein	28	90,3	90,3	100,0
	Gesamt	31	100,0	100,0	

4.2.5 Lokalisation der Mammatumore

In die folgenden Darstellungen (siehe Abbildung 14) gingen 45 Tumore ein, die durch Mastektomie entfernt und pathohistologisch nach WHO (siehe 3.3) entweder als benigne oder maligne Neoplasie klassifiziert wurden. Alle 31 Hündinnen hatten mindestens vier Drüsenkomplexe je Gesäugeleiste.

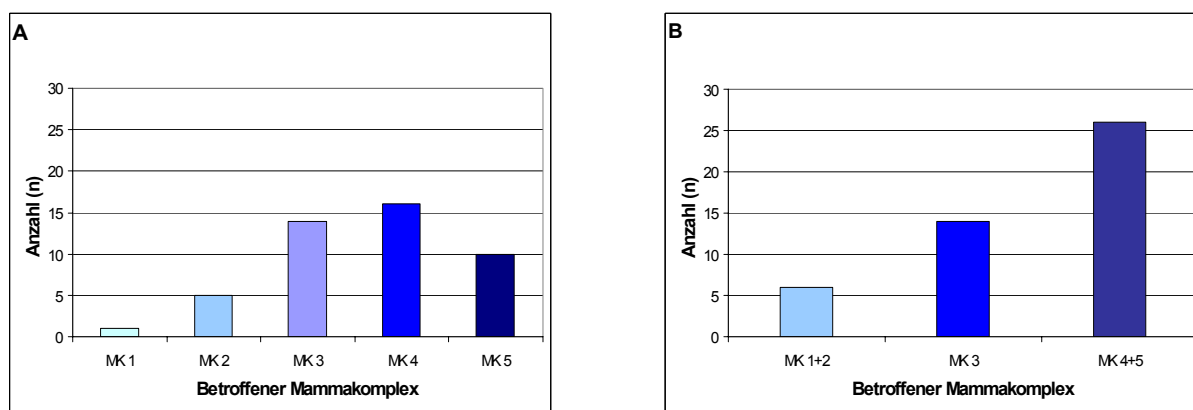


Abbildung 14 Diagramm A: Darstellung der Verteilung von Mammatumoren in den einzelnen Mammakomplexen. Diagramm B: Darstellung des Verteilungsmusters von Mammatumoren in caninen Mammaleisten.

Balkendiagramm A: In absoluten Zahlen (siehe Abbildung 14, Diagramm A) waren die meisten Mammatumore im abdominal kaudalen Mammakomplex (MK = 4) mit $n = 15$ (35 %) lokalisiert, gefolgt von dem abdominal kranialen (MK = 3) mit $n = 14$ (30 %) und dem inguinalen (MK = 5) mit $n = 10$ (22 %) Mammakomplex. Geringere Erkrankungszahlen wiesen der thorakal kraniale (MK = 1) mit $n = 1$ (2 %) sowie der thorakal kaudale (MK = 2) mit $n = 5$ (11 %) Mammakomplexen auf.

Balkendiagramm B: In dem Diagramm B der Abbildung 14 wird die Tendenz des Auftretens von Mammatumoren in den als Einheit angesehenen abdominal kaudalen (MK = 4) und inguinalen Mammakomplexen (MK = 5) verdeutlicht. 56 % der diagnostizierten Mammatumore waren im abdominal kaudalen und inguinalen lokalisiert. 31 % der Tumore traten im abdominal kranialen und 13 % im thorakal kranialen und kaudalen Komplex auf. Eine Prädisposition zwischen rechter und linker Gesäugeleiste bestand nicht.

4.3 LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER HÄMATOXILIN-EOSIN (HE)-FÄRBUNGEN

Nach Entnahme von 70 neoplastisch veränderten Proben und 70 makroskopisch neoplastisch unveränderten Proben aus 40 caninen Gesäugeleisten (siehe 3.1) erfolgte die Anfertigung von HE-Schnitten (siehe 3.3.1). Die Schnitte dienten der genaueren Klassifikation der Mammatumore nach WHO (dargestellt in 3.3.2.1). Insgesamt 45 Tumore konnten per Lichtmikroskop entweder als simples Karzinom, komplexes Karzinom oder als Adenom diagnostiziert werden. Im Folgenden wurden Präparate bei lichtmikroskopischer Vergrößerung mit dem Olympus BX41TF-Fotoscope in der 10er und 20iger Vergrößerung fotografiert. Die Zusammenstellung der HE-Bilder (siehe ab Seite - 52 -) erfolgte repräsentativ nach Tumortyp. Jeder Tumorabbildung wurde das korrespondierende nichtneoplastische Drüsengewebe (Normalgewebe) gegenübergestellt. In Abbildung 16 wurde zusätzlich die Metastasierung in den Inguinallymphknoten (Abbildung C und D) dargestellt.

Tabelle 12 Anzahl der nach WHO klassifizierten Tumoren

Simple Karzinome	29
Hochmaligne simple Karzinome	2
Komplexe Karzinome	11
Adenome	3

Hochmaligne simple Karzinome = metastasierende simple Karzinome

4.3.1 Gruppe der simplen Karzinome

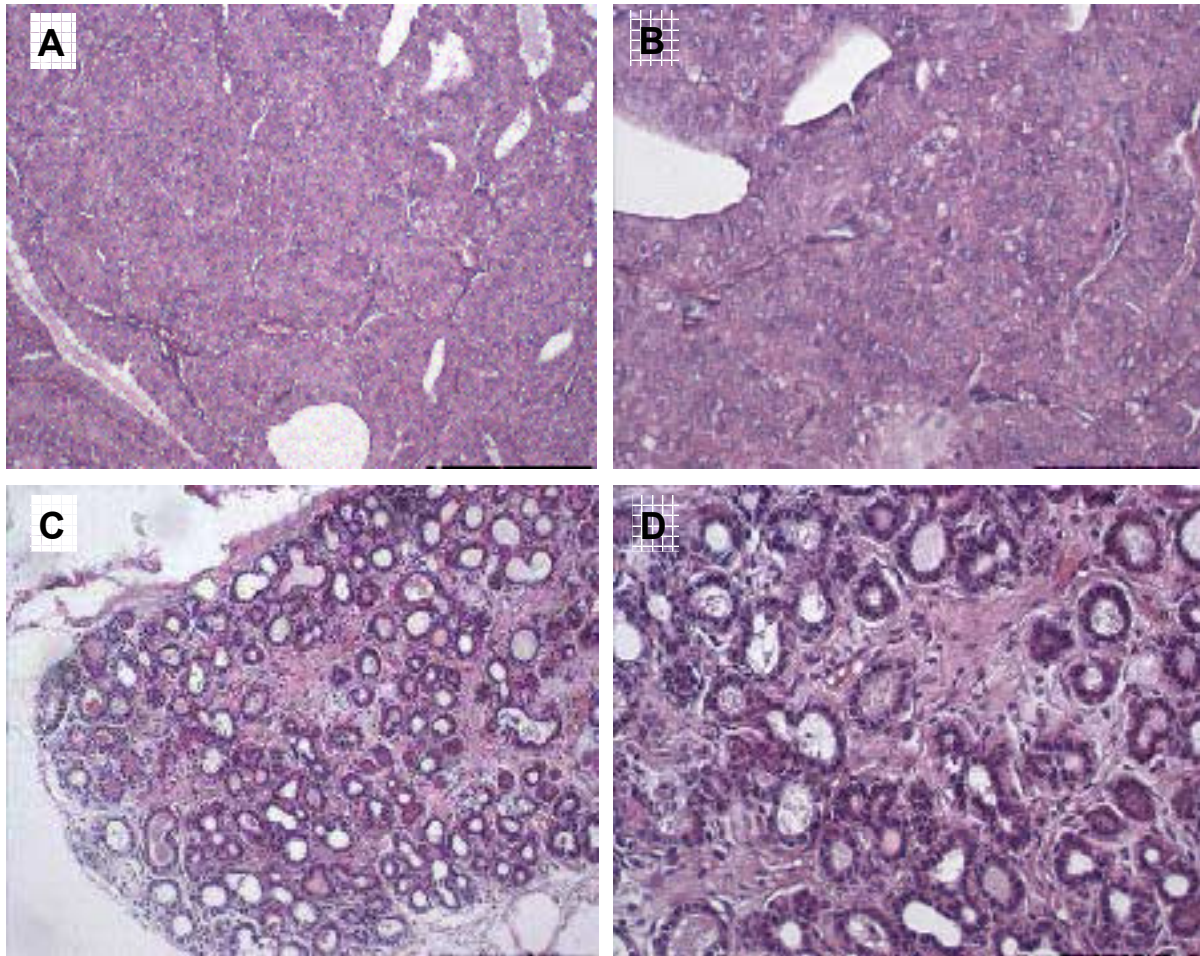


Abbildung 15 ***Patho-ID: 70***
A: Simplex Karzinom (10er Vergrößerung)
B: Simplex Karzinom (20iger Vergrößerung)
C: Korrespondierendes nichtneoplastisches Mammagewebe (10er Vergrößerung)
D: Korrespondierendes nichtneoplastisches Mammagewebe (20iger Vergrößerung)

4.3.1.1 Hochmaligne simple Karzinome

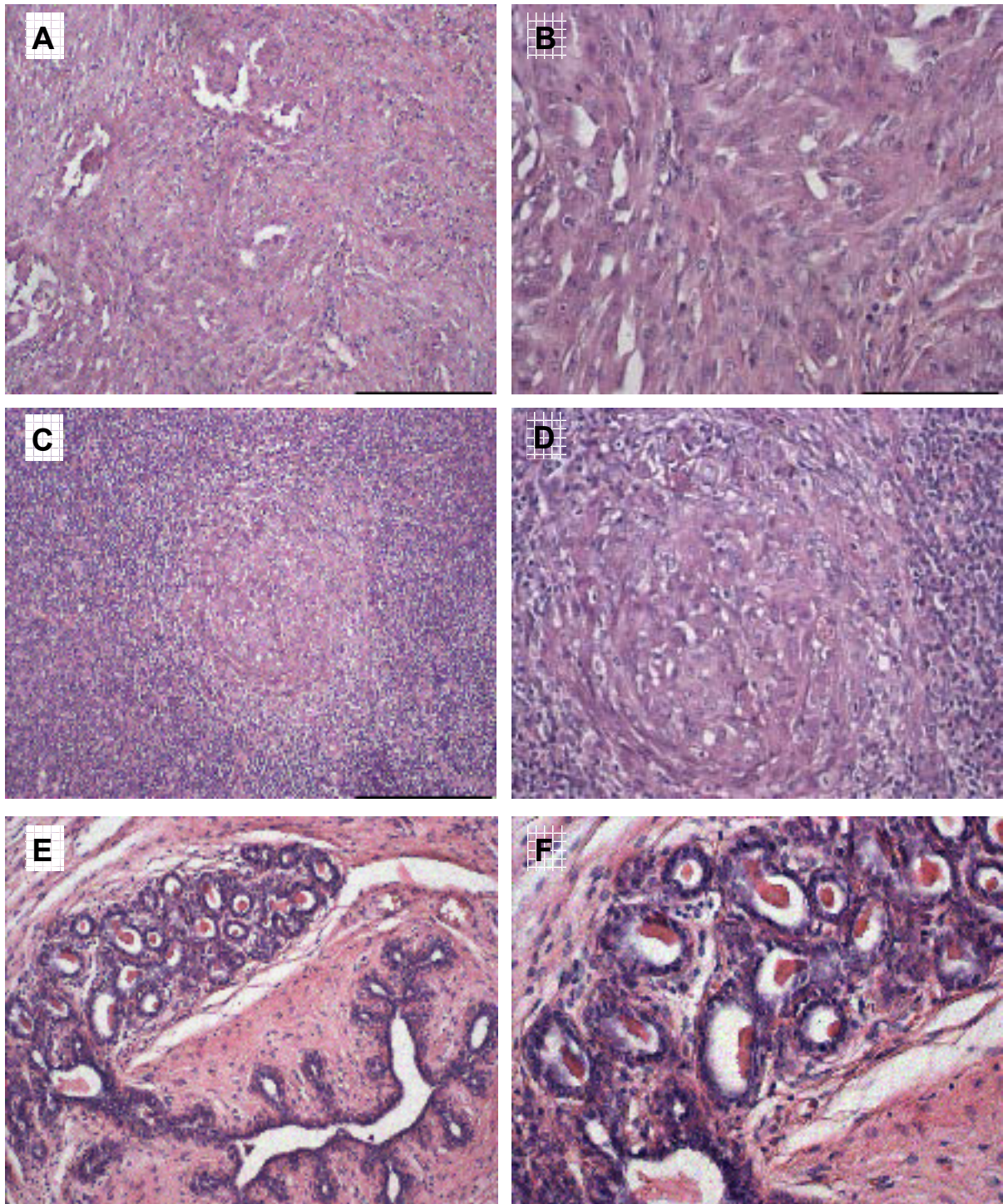


Abbildung 16 Patho-ID: 69

- A: Hochmalignes simples Karzinom (10er Vergrößerung)
- B: Hochmalignes simples Karzinom (20iger Vergrößerung)
- C: Lymphknotenmetastase (10er Vergrößerung)
- D: Lymphknotenmetastase (20iger Vergrößerung)
- E: Korrespondierendes nichtneoplastisches Mammagewebe (10er Vergrößerung)
- F: Korrespondierendes nichtneoplastisches Mammagewebe (20iger Vergrößerung)

4.3.2 Gruppe der komplexen Karzinome

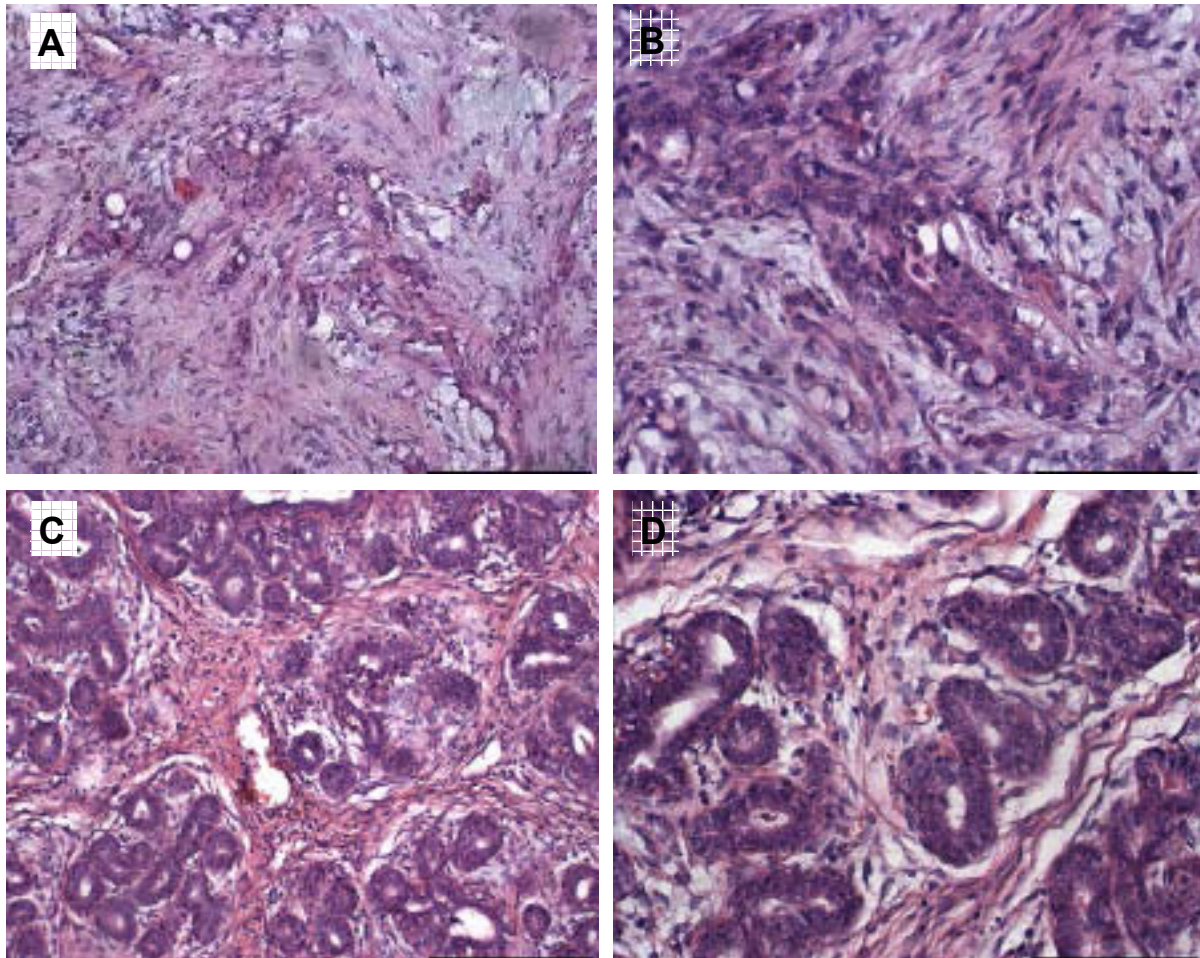


Abbildung 17 *Patho-ID: 52*

- A: Komplexes Karzinom (10er Vergrößerung)
- B: Komplexes Karzinom (20iger Vergrößerung)
- C: Korrespondierendes nichtneoplastisches Mammagewebe (10er Vergrößerung)
- D: Korrespondierendes nichtneoplastisches Mammagewebe (20iger Vergrößerung)

4.3.3 Gruppe der Adenome

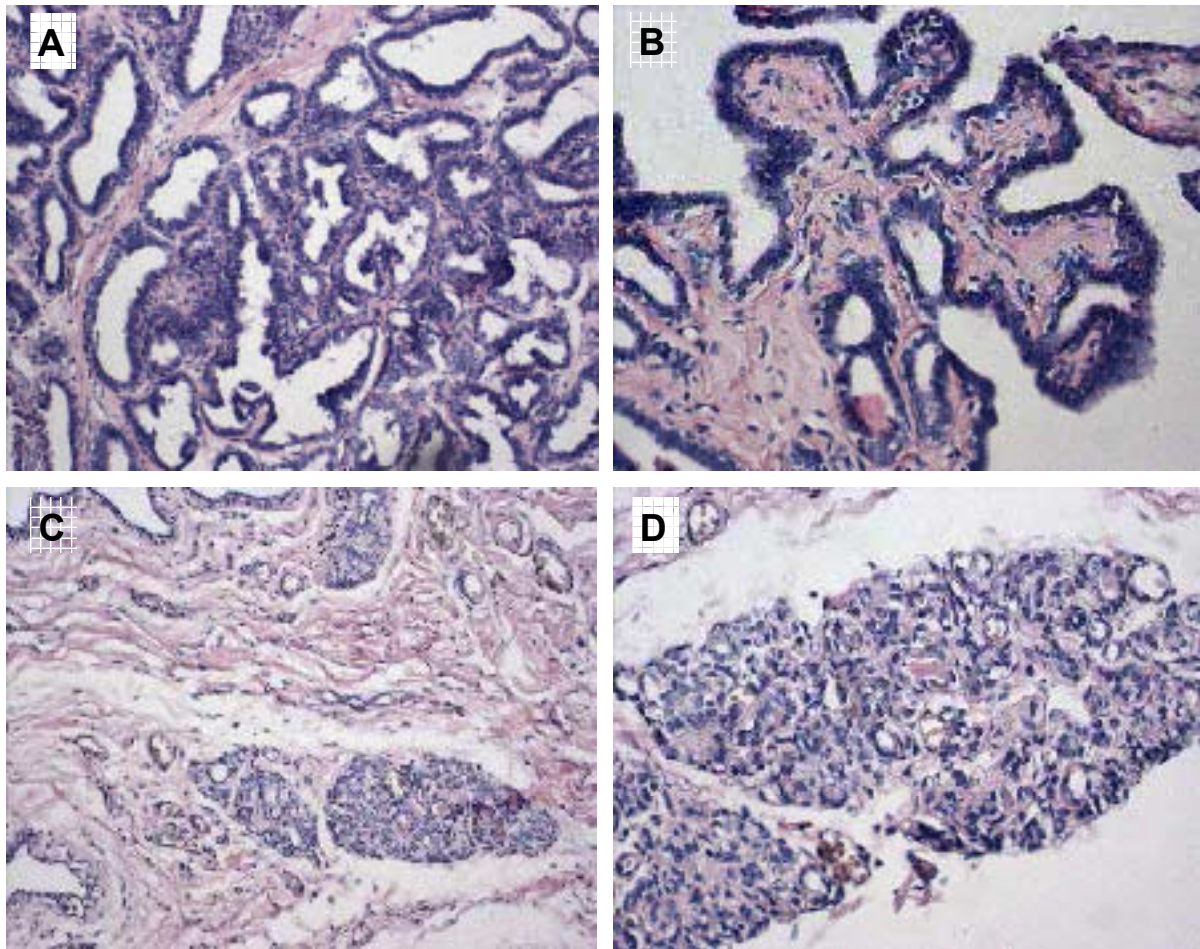


Abbildung 18 Patho-ID: 51

- A: Adenom (10er Vergrößerung)
- B: Adenom (20iger Vergrößerung)
- C: Korrespondierendes nichtneoplastisches Mammagewebe (10er Vergrößerung)
- D: Korrespondierendes nichtneoplastisches Mammagewebe (20iger Vergrößerung)

4.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.4.1 RNA-Konzentration und RNA-Integrität

Nach Aufarbeitung der Gewebeproben aus caninem Milchdrüsengewebe und anschließender Isolierung von Gesamt-RNA wurde neben der photometrischen Konzentrationsbestimmung die Qualität der RNA-Proben mit Hilfe des „Agilent 2100 bioanalyzer“ (Fa. Agilent) (siehe 3.4.4) ermittelt.

4.4.1.1 RNA-Konzentration

Die isolierten RNA-Proben wiesen in der spektralphotometrischen Analyse (siehe 3.4.3) eine durchschnittliche Konzentration von 350 ng/µl auf. Zwei von 90 Proben zeigten maximale Extinktionswerte bei 230, 280 oder 320 nm und mussten wiederholt isoliert werden.

4.4.1.2 RNA-Integrität

In der Kapillarelektrophorese (siehe 3.4.4.1) wiesen die isolierten RNA-Proben eine durchschnittliche Integrität (RIN) von 8,2 auf. Bei keiner der Proben wurde eine Integrität von kleiner als 5 festgestellt, so dass alle in weiteren Untersuchungen verwendet werden konnten. Eine Tabelle mit Einzelergebnissen ist im Anhang unter 9.2.1 (siehe Tabelle 16) zu finden.

4.4.2 Quantitative PCR (qPCR)

4.4.2.1 Qualitativer Nachweis von Targetgenen

4.4.2.1.1 Primerherstellung von TGF-beta1, 2, 3 und LTBP-1, -3 und -4

Nach Isolierung der Gesamt-RNA (siehe 3.4.2.2) wurden anhand veröffentlichter, homologer caniner und humaner Nukleotidsequenzen spezifische Primerpaare für die Amplifikation der mRNA-Sequenz der Proteine TGF-beta1, 2 und 3 sowie der Proteine LTBP-1, -3 und -4 ausgewählt und in die qPCR eingesetzt (siehe 3.4.6.4). Bei der Existenz verschiedener caniner Transkriptvarianten für ein Protein (dargestellt in Tabelle 13) wurden Primerpaare ausgewählt, die den homologen Bereich (Sequenzabschnitt) der ausgewählten Varianten erfassen. Ziel war die Berücksichtigung aller für das jeweilige Targetgen bekannten Transkriptvarianten. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die ausgewählten Primer nur eine Variante amplifizieren, welche möglicherweise im Gegensatz zu den anderen vorhandenen Transkriptvarianten keiner Regulation (vermehrter oder verminderter Expression) unterliegt oder eine Splicevariante des jeweiligen Gens für einen spezifischen Gewebetyp darstellt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen (dargestellt unter 3.4.6.4).

Tabelle 13 Für Primerdesign verwendete Gensequenzen von GenBank

Targetgen	Spezies	GenBank Accession Number	Transkriptvariante/ Complete cds.
TGF-beta 1	Canin	L_34956	complete cds.
	Human	NM_003238	complete cds.
TGF-beta 2	Canin	XM_545713	1
	Canin	XM_853503	2
	Canin	XM_853546	3
	Canin	XM_853584	4
	Canin	XM_853629	5
	Canin	XM_853665	6
TGF-beta 3	Human	BC_018503	complete cds.
	Canin	XM_547918	1
	Canin	XM_849026	2
	Canin	XM_863109	4
	Canin	XM_863112	5
	Canin	XM_863118	6
LTBP-1	Human	NM_206943	complete cds.
	Human	NM_000627	complete cds.
	Canin	XM_532928	1
	Canin	XM_857825	2
LTBP-3	Human	NM_021070	complete cds.
	Canin	XM_540857	complete cds.
LTBP-4	Human	NM_003573	complete cds.
	Canin	XM_533664	complete cds.

Complete cds = Vollständige, kodierende Sequenz (Complete coding sequence)

4.4.2.1.2 Sequenzierergebnisse

Der qualitative Nachweis für sämtliche GOIs wurde auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR erbracht (siehe 3.4.6.3). Nach Ablauf der PCR wurden die amplifizierten PCR-Produkte aufgereinigt und im nachfolgenden Arbeitsschritt zur Sequenzbestimmung versendet (siehe 3.4.6.4.2).

Die ermittelten Sequenzen wurden mit homologen des Hundes und des Menschen verglichen (Alignment). Hierbei ergab sich für alle Sequenzen eine Homologie von mindestens 80% (dargestellt in Abbildung 19 bis Abbildung 24). Die »GenBank Accession Numbers« der Vergleichssequenzen sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Ergebnisse

```

      *           820           *           840           *           860           *           880
LTBP-3comp : tccctcccgaacacagtgcatcgcagacaagccagaggagagagcctgtgtttccgcctggtgagcccgagcaccagt : 880
LTBP-3 s : -----ACAGTGCATTGCAGACAAGCCAGAGGAGA-GAGCCTGCCGTTCCGCCTGGT GAGCCCGGAGCACCAGT : 67
LTBP-3 as : -----ACAGTGCATTGCAGACAAGCCAGAGGAGAA GAGCCTGTGTTTCCGCCTGGT GAGCCCGGAGCACCAGT : 68
              ACAGTGCATTGCAGACAAGCCAGAGGAGAA GAGCCTGTGTTTCCGCCTGGT GAGCCCGGAGCACCAGT

      *           900           *           920           *           940           *           960
LTBP-3comp : gccagcaccactgaccacgcgccttaccgcagctctgctgctgcagtggtgggcaaggcctggggtgagaggtgccag : 960
LTBP-3 s : -----GCCAGCACCCTGACCACGCGCCTTACCCGCCAGCTCTGCTGCTGCAGTGTGGGCAAGGCCTGGGGT GCGAGGTGCCAG : 147
LTBP-3 as : -----GCCAGCACCCTGACCACGCGCCTTACCCGCCAGCTCTGCTGCTGCAGTGTGGGCAAGGCCTGGGGT GCGAGGTGCCAG : 148
              GCCAGCACCCTGACCACGCGCCTTACCCGCCAGCTCTGCTGCTGCAGTGTGGGCAAGGCCTGGGGT GCGAGGTGCCAG

      *           980           *           1000           *           1020           *           1040
LTBP-3comp : cgc----- : 963
LTBP-3 s : -----CGC----- : 150
LTBP-3 as : -----CGC----- : 151
              CGC
  
```

Abbildung 23 Vergleich der caninen cDNA des sequenzierten PCR-Produktes von LTBP-3 (dargestellt als LTBP-3s und LTBP-3as) mit einer für das Targetgen bekannten caninen vollständigen kodierenden Nukleotidsequenz (complete cds).

```

      *           340           *           360           *           380           *           400
L4 can ccd : acaggtgtccctcaactggcagccactgacgctgcaaggagcccgagccggagggcccccacagcgcgccctgccggcca : 400
L4 seq s : -----cccgagccggagggcccccacagcgcgccctgccggcca : 39
L4 seq as : -----ggagggcccgagccggagggcccccacagcgcgccctgccggcca : 44
              ggagggCCCGAGCCGGAGGCCCCACAGCGCGCCCTGCCGGCCA

      *           420           *           440           *           460           *           480
L4 can ccd : gaccgggtcctgtgtccc----- : 419
L4 seq s : -----gaccgggtcctgtgtccc----- : 58
L4 seq as : -----gaccgggtcctgtgtccc----- : 63
              GACCCGGGTCTGTGTCCC
  
```

Abbildung 24 Vergleich der caninen cDNA des sequenzierten PCR-Produktes von LTBP-4 (dargestellt als L4seq s und L4seq as) mit einer für das Targetgen bekannten caninen vollständigen kodierenden Nukleotidsequenz (complete cds).

Mit Hilfe der qRT-PCR und anschließender Sequenzierung gelang der qualitative Nachweis der mRNA von TGF-beta1, 2 und 3 sowie von LTBP-1, -3 und -4. Die PCR-Produkte (siehe Tabelle 14) wurden in „GenBank“ (NIH Genebank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) veröffentlicht.

Tabelle 14 Veröffentlichte Gensequenzen in GenBank

Proteinname	Abkürzung	Datum der Veröffentlichung	GenBank Accession number
Transforming Growth Factor beta 1	TGF-beta 1	31.07.2006	DQ787012
Transforming Growth Factor beta 2	TGF-beta 2	31.05.2006	DQ 525400
Transforming Growth Factor beta 3	TGF-beta 3	31.05.2006	DQ 525399
Latent TGF-beta Binding Protein-1	LTBP-1	29.05.2006	DQ 517443
Latent TGF-beta Binding Protein-3	LTBP-3	22.08.2006	DQ 837006
Latent TGF-beta Binding Protein-4	LTBP-4	-	unveröffentlicht

4.4.2.2 Relative Quantifizierung

4.4.2.2.1 QPCR Assay-Etablierung

Parallel zum qualitativen Nachweis der Zielmoleküle (TGF-beta1, 2 und 3 sowie LTBP-1, -3 und -4) wurde für jedes ein assay erstellt (für qPCR assay siehe Material- und Methoden unter 3.4.6.5.1).

Mit der Durchführung einer Regressionsanalyse konnte die Effizienz von PCR-Reaktionen überprüft werden. Es wurde eine definierte Ausgangsmenge an Target-DNA in die qPCR eingesetzt und gegen die Zykluszahl in einer logarithmischen Funktion dargestellt. In der Regressionsgeraden wurden verschiedene Parameter beurteilt. Zum einen wurde die Steigung der Regressionsgeraden (Slope) ausgewertet. Bei einer Steigung von -3,333 (absteigende Verdünnungsreihe) liegt die PCR-Effizienz bei 100 %. Der »Slope« ist ein Maß der realen Amplifikation und gilt als Indikator für Amplifikationseffizienz. Der Toleranzbereich wurde auf 90 % < Effizienz < 100 % festgelegt (siehe 3.4.6.5.1). Zum anderen wurde der Korrelationskoeffizient betrachtet. Dieser Wert steht für die Linearität der PCR-Effizienz in unterschiedlichen Mengenbereichen der eingesetzten Kopienzahl. Der Korrelationskoeffizient liegt im Idealfall bei 1.

Die Etablierung konnte erfolgreich für alle oben genannten Targetgene durchgeführt werden. Die Effizienzdaten können der Abbildung 25 bis Abbildung 30 entnommen werden.

4.4.2.2.1.1 TGF-beta1

Die Vorversuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von TGF-beta1 hatten eine Sensitivität von 0,5 fg (Femtogramm), eine Effizienz von 91,1 % und für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 92°C festgestellt. Es wurde ein Temperaturoptimum von 58°C für Hybridisierung und Neustrangsynthese festgestellt und der qPCR assay zeigte sich nach den definierten Kriterien (siehe 3.4.6.5.1) als spezifisch.

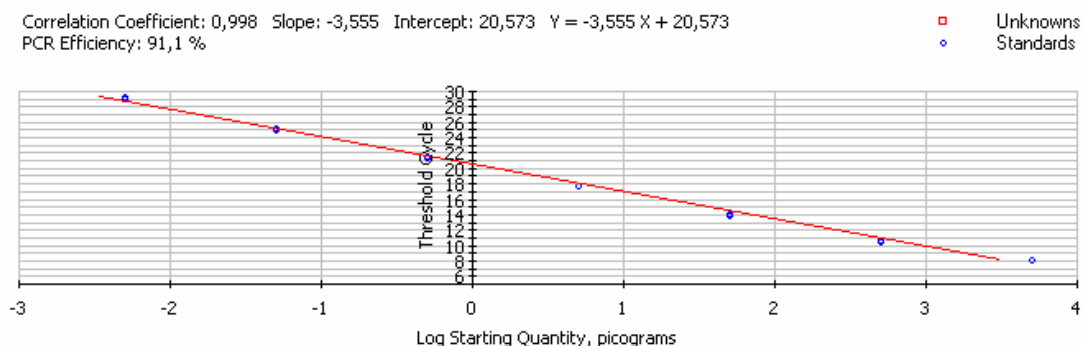


Abbildung 25 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse von TGF-beta1

4.4.2.2.1.2 TGF-beta2

Die Vorversuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von TGF-beta2 hatten eine Sensitivität von 0,5 fg, eine Effizienz von 98,7 % und für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 85°C festgestellt. Es wurde ein Temperaturoptimum von 58°C für Hybridisierung und Neustrangsynthese festgestellt und der qPCR assay zeigte sich nach den definierten Kriterien (siehe 3.4.6.5.1) als spezifisch.

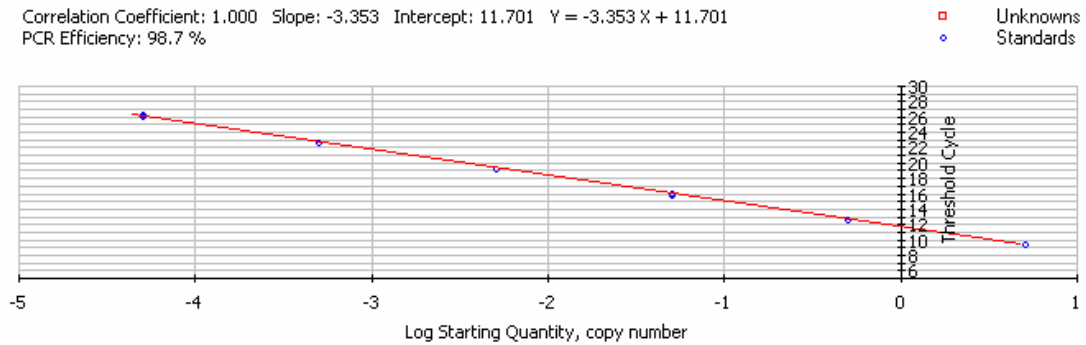


Abbildung 26 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse von TGF-beta2

4.4.2.2.1.3 TGF-beta3

Die Vorversuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von TGF-beta3 hatten eine Sensitivität von 0,5 fg, eine Effizienz von 96,6 % und für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 84°C festgestellt. Es wurde ein Temperaturoptimum von 58°C für Hybridisierung und Neustrangsynthese festgestellt und der qPCR assay zeigte sich nach den definierten Kriterien (siehe 3.4.6.5.1) als spezifisch.

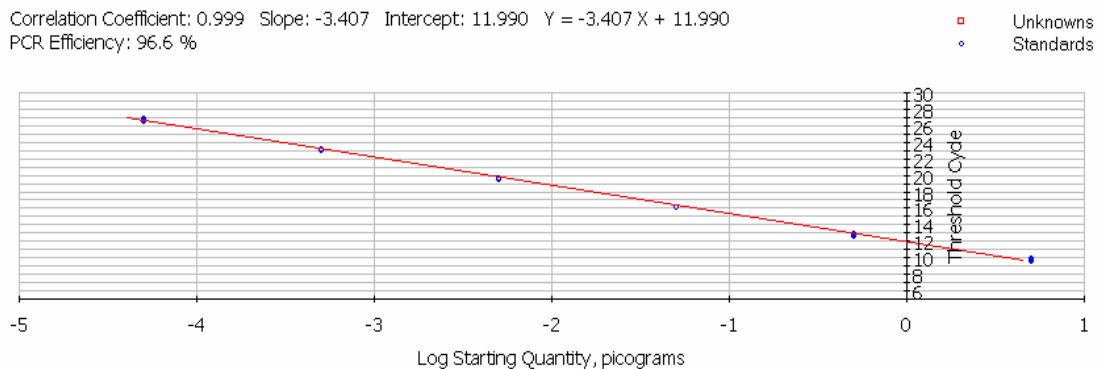


Abbildung 27 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse von TGF-beta3

4.4.2.2.1.4 LTBP-1

Die Vorversuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von LTBP-1 hatten eine Sensitivität von 0,5 fg, eine Effizienz von 95,5 % und für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 85°C festgestellt. Es wurde ein Temperaturoptimum von 58°C für Hybridisierung und Neustrangsynthese festgestellt und der qPCR assay zeigte sich nach den definierten Kriterien (siehe 3.4.6.5.1) als spezifisch.

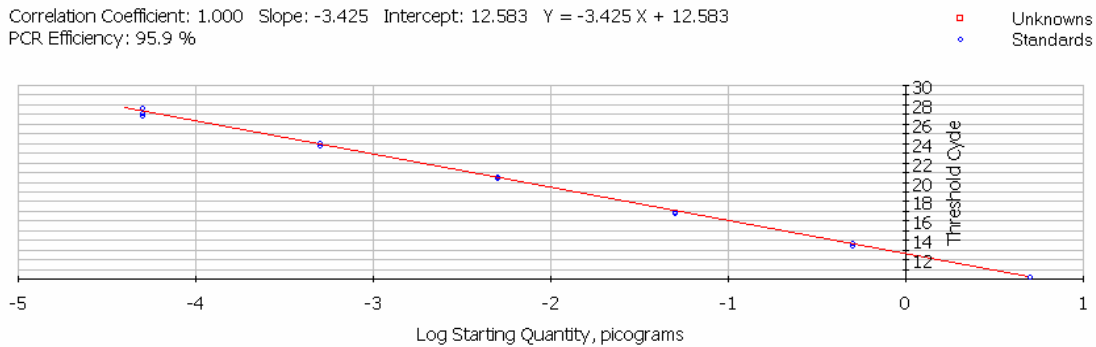


Abbildung 28 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse von LTBP-1

4.4.2.2.1.5 LTBP-3

Die Vorversuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von LTBP-3 hatten eine Sensitivität von 0,5 fg, eine Effizienz von 97,5 % und für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 92°C festgestellt. Es wurde ein Temperaturoptimum von 58°C für Hybridisierung und Neustrangsynthese festgestellt und der qPCR assay zeigte sich nach den definierten Kriterien (siehe 3.4.6.5.1) als spezifisch.

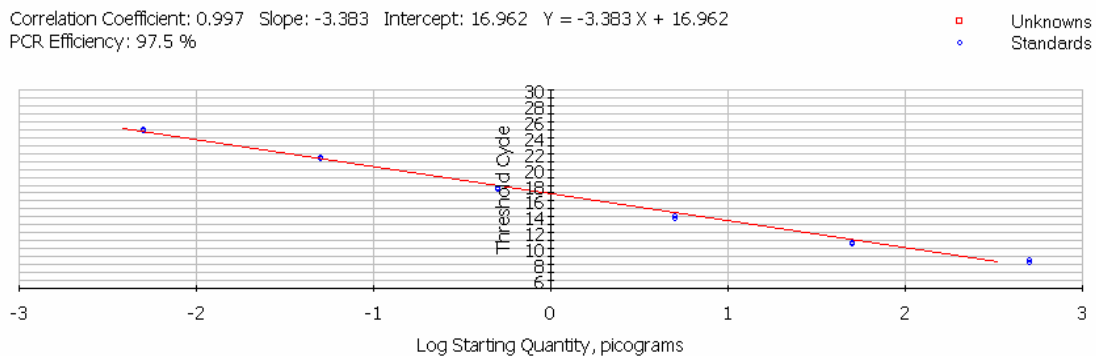


Abbildung 29 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse von LTBP-3

4.4.2.2.1.6 LTBP-4

Die Vorversuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von LTBP-4 hatten eine Sensitivität von 0,5 fg, eine Effizienz von 99,1 % und für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 86°C festgestellt. Es wurde ein Temperaturoptimum von 58°C für Hybridisierung und Neustrangsynthese festgestellt und der qPCR assay zeigte sich nach den definierten Kriterien (siehe 3.4.6.5.1) als spezifisch.

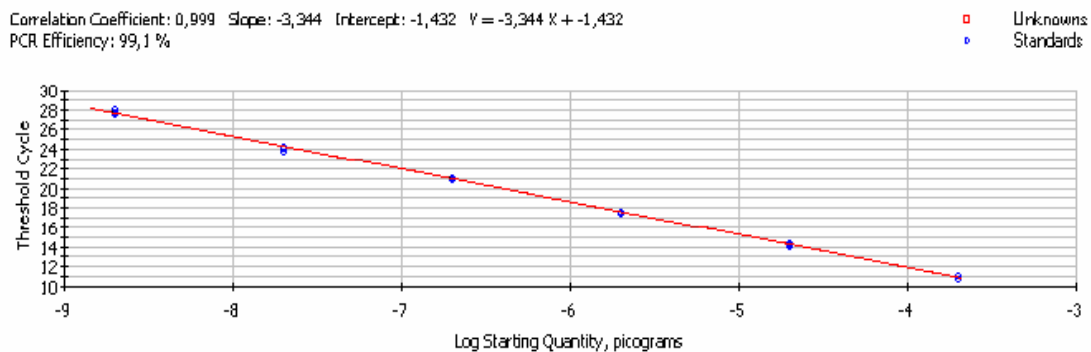


Abbildung 30 Graphische Darstellung der Regressionsanalyse von LTBP-4

4.4.2.3 Bestimmung der C_T-Werte

Zur Bestimmung der relativen Menge an Zielgenen bzw. Referenzgenen in den untersuchten cDNA-Proben wurden die in der qPCR für jedes GOI (Gene of interest) und für die jeweiligen Referenzgene entsprechenden C_T-Werte ermittelt (siehe 3.4.6.5.2).

Die Einzelergebnisse (C_T-Werte) für jedes Target- und Referenzgen wurden geordnet nach Patho-ID (vergebene Fallnummer) und der zugehörigen cDNA-ID analog der WHO-Klassifizierung im Anhang (siehe 9.2.2.1) tabellarisch dargestellt.

4.4.2.4 Referenzgene

In den Untersuchungen zur Ermittlung geeigneter Referenzgene (siehe 3.4.6.5.5.2) wurde festgestellt, dass ATP 5 B (ATP Synthase (H⁺ transporting mitochondrial F1 complex, β polypeptide)), HPRT (Hypoxanthine-Phosphoribosyl Transferase 1) und RP L32 (Ribosomales Protein L32) aus der Liste der 11 überprüften Referenzgene (18s rRNA, 28s rRNA, GAPDH, β -Aktin, Ubiquitin, β -2-Mikroglobulin, YWHAZ, TATA-Box bindendes Protein, HPRT, ATP-Synthase Untereinheit 5B und Cyclophyllin) die stabilste kombinierte Expressionsrate aufwiesen ((Etschmann, Wilcken et al. 2006), siehe 3.4.6.5.5.2, Tabelle 10).

4.4.2.5 QPCR-Kontrollen

Zur Untersuchung der RNA-Proben (siehe 3.4.2.2) auf Kontamination mit genomischer DNA wurde die relative Menge an β -Aktin-Sequenzen in den RNA-Proben untersucht (siehe 3.4.6.5.6). Sie betrug durchschnittlich 0,5 %. Keine der eingesetzten RNA-Proben wies im Vergleich zu der korrespondierenden cDNA-Probe mehr als 4 % β -Aktin-Kopien auf und musste aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Berechnet wurde die relative Menge an β -Aktin-Sequenzen in den RNA-Proben nach folgendem Beispiel:

Eine C_T -Wert-Differenz von 1 impliziert einen Faktor zwei. Ergibt eine qPCR beispielsweise von β -Aktin im RNA-Lauf für Probe A einen C_T -Wert von 22 und der entsprechende cDNA-Lauf einen C_T -Wert von 21 (Differenz = 1), dann enthält die RNA halb so viele β -Aktin-Kopien wie die cDNA. Damit liegt die Kontaminationsrate an genomischer DNA bei 50 %. Läge der C_T -Wert des RNA-Laufes bei 23, würde dies eine Kontaminationsrate von 25 % bedeuten.

4.4.2.6 Relative Expression

4.4.2.6.1 Allgemeines

Für eine umfassende Beurteilung der Ergebnisse aus den qPCR-Experimenten wurde zunächst die Expressionsstabilität der Referenzgene aufgezeigt (siehe 4.4.2.6.1). Die Ergebnisse wurden mit dem Programm »SPSS 12.0 für Windows« als Boxplot (siehe 3.5) für jede Tumorgruppe graphisch dargestellt.

4.4.2.6.2 Relative Expression der Referenzgene

Die Expressionsstabilität der Kombination aus Referenzgenen ist Voraussetzung für die Zuverlässigkeit der mit Hilfe der Referenzgene normalisierten (siehe 3.4.6.5.5.1) qPCR-Daten der GOIs (Dheda, Huggett et al. 2005). Für die Bewertung der Expressionsraten der Referenzgene (siehe 3.4.6.5.4) wurden sowohl die Vertreter der Basisprobengruppe (Basisprobe siehe 3.4.6.5.4) als auch die Vertreter der Testprobengruppe (Testprobe siehe 3.4.6.5.4), bezogen auf ihren Median, relativ quantifiziert (siehe Gleichung 2). Die FC-Werte (Einzelwerte siehe Anhang 9.2.2.2) für Tumor- und Normalgewebe (nichtneoplastisches Mammagewebe) wurden bezogen auf die einheitliche Probennummer voneinander subtrahiert (d.h. $FC\text{-Wert}_{\text{Ref. Normalgewebe der Probe 39}} - FC\text{-Wert}_{\text{Ref. Tumor der Probe 39}}$) und als Boxplot für jede Tumorgruppe (1 = Simple Karzinome, 2 = komplexe Karzinome, 3 = Adenome) in Abbildung 31 dargestellt. Eine optimale Stabilität der Referenzgene besteht bei Werten um Null. Die Werte differierten bis auf einen Extremwert in der Gruppe der simplen Karzinome (-1,5) maximal um 0 ± 1 .

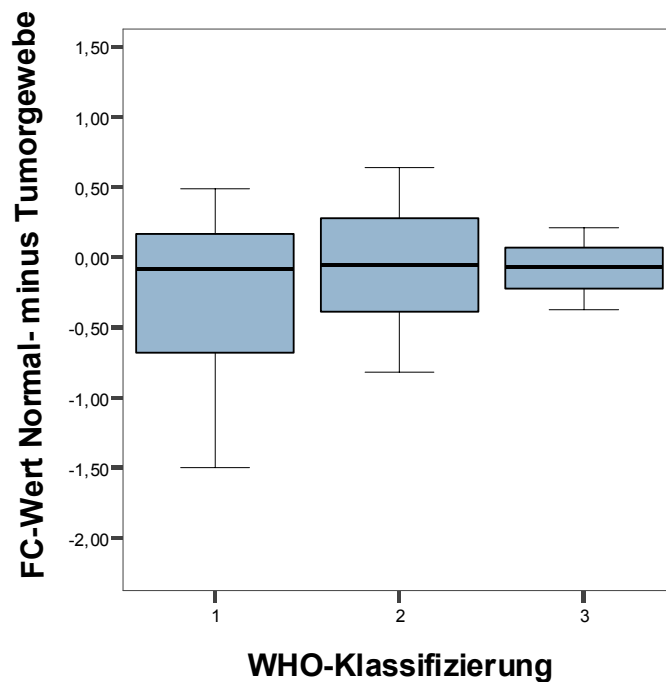


Abbildung 31 Darstellung der Expressionsstabilität der Referenzgene in Bezug auf das jeweilige nichtneoplastische Mammagewebe (Kontrolle) in: Simplen Karzinomen (boxplot 1, links), komplexen Karzinomen (boxplot 2, mittig) und Adenomen (boxplot 3, rechts)

4.4.2.6.3 Ausschluss der Hautproben als Kontrollgewebe

Im nächsten Arbeitsschritt wurde ermittelt, ob Haut als potentielles Kontrollgewebe (Basisprobengewebe) nichtneoplastisches Mammagewebe (Normalgewebe) zur Darstellung des Expressionsmusters der GOIs ersetzen kann. Dies wurde mit Hilfe vergleichender Balkendiagramme geprüft.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expressionsrate eines Targetgens in einer Testprobe (hier Tumorprobe) im Vergleich zur Expressionsrate des gleichen Targetgens in der korrespondierenden Basisprobe (Kontrollprobe) anhand von Ergebnissen aus qPCR-Experimenten (C_T -Werte, siehe 3.4.6.1) berechnet. In der vorliegenden Arbeit wurde die relative Quantifizierung der Targetgene in den Tumorproben mit nichtneoplastischem Mammarydrüsenengewebe als Kontrollgewebe und mit Haut als potentiellm Kontrollgewebe durchgeführt. Die Eignung der Haut als Kontrollgewebe wurde durch den Vergleich der relativen Expressionsraten der Targetgene in caninen Mammatumoren mit denen des nichtneoplastischen Mammagewebes als Kontrolle ermittelt. Dies wurde repräsentativ für zwei GOIs (TGF-beta3 (Diagramm A und B) und LTBP-1 (Diagramm C und D)) für unterschiedliche Tumorgruppen in Balkendiagrammen graphisch dargestellt (siehe Abbildung 32).

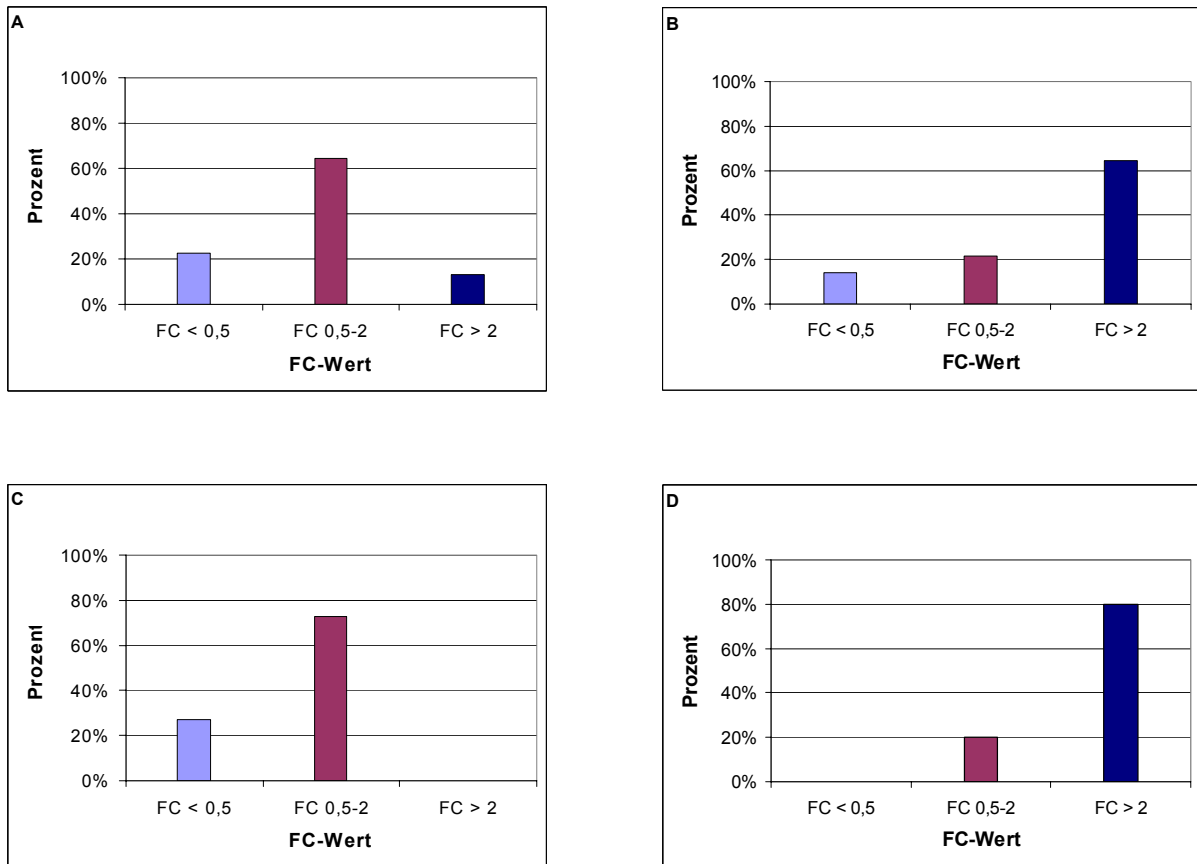


Abbildung 32 Die Balkendiagramme »A« und »B« stellen die relative Expression von TGF-beta3 in simplen Karzinomen dar:
 Diagramm A: Kontrolle = nichtneoplastisches Mammagewebe
 Diagramm B: Kontrolle = Haut
 Die Balkendiagramme »C« und »D« zeigen die unterschiedliche relative Genexpression von LTBP-1 in komplexen Karzinomen:
 Diagramm C: Kontrolle = nichtneoplastisches Mammagewebe
 Diagramm D: Kontrolle = Haut

Die »Y-Achse« stellt die Häufigkeitsverteilung (f) in Prozent dar. Die »X-Achse« ist unterteilt in FC-Wert < 0,5 (verminderte Expression), in FC-Wert 0,5-2 (unreguliert) und in FC-Wert>2 (vermehrte Expression).

Die Vergleichsabbildungen in Abbildung 32 verdeutlichen anhand der TGF-beta3-Expression in simplen Karzinomen (Diagramm A und B) sowie der LTBP-1-Expression in komplexen Karzinomen (Diagramm C und D), dass ein eindeutiger Expressionsunterschied besteht, sobald »Haut« anstelle von »nichtneoplastischem Mammagewebe« als Kontrolle eingesetzt wird. Die FC-Werte können dem Anhang unter 9.2.2.3 entnommen werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde »Haut« als Kontrollgewebe ausgeschlossen.

4.4.2.6.4 Relative Expression der einzelnen GOIs

4.4.2.6.4.1 Einleitung

Der Unterschied der relativen Expression der einzelnen Targetgene nach Tumortyp (WHO-Klassifizierung siehe 3.3.2.1) und Malignitätsgrad wurde mit Hilfe von Balkendiagrammen dargestellt. Die »Y-Achse« zeigt die Häufigkeitsverteilung der Proben (f) in Prozent. Die »X-Achse« stellt die FC-Werte dar. Diese können entweder kleiner als 0,5 (verminderte Expression), größer als 2 (vermehrte Expression) sein oder zwischen 0,5 und 2 (keine Regulation) liegen. Die FC-Wertrohdaten können im Anhang unter 9.2.2.4 eingesehen werden. Die Probenanzahl (n) variierte hinsichtlich der WHO-Klassifizierung für simple Karzinome n = 29, hochmaligne simple Karzinome (n = 2), komplexe Karzinome n = 11 und Adenome n = 3.

4.4.2.6.4.2 TGF-beta1

Die relativen Expressionsraten des Einzelgens »TGF-beta1« in den oben erwähnten Tumorgruppen sind in Abbildung 33 (siehe Seite - 68 -) dargestellt.

Balkendiagramm A: Es wurden 29 simple Karzinome (100 %) untersucht. In 41 % der untersuchten Proben wurde TGF-beta1 vermindert exprimiert (FC-Wert < 0,5). 45 % der Proben wiesen einen FC-Wert zwischen 0,5 und 2 auf (keine Regulation der Genexpression). In 14 % der Proben war eine vermehrte TGF-beta1-Expression festzustellen (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm B: Das Diagramm B beschreibt die Expression von TGF-beta1 in hochmalignen simplen Karzinomen. Bei beiden der in die qPCR (siehe 3.4.6) eingesetzten Proben war die TGF-beta1-Expression vermehrt (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm C: Das Diagramm C spiegelt die TGF-beta1-Expression in komplexen Karzinomen wider. Zum Einsatz kamen 11 Proben (100 %). In 27 % der Proben war der FC-Wert < 0,5 (verminderte Expression); 64 % der Proben waren mit einem FC-Wert zwischen 0,5 und 2 in Bezug auf TGF-beta1 unreguliert und 9 % der Proben wiesen eine erhöhte TGF-beta1-Expression auf (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm D: Das Diagramm D stellt die TGF-beta1-Expression in Adenomen dar (n = 3). Zu gleichen Teilen war das Targetgen vermindert exprimiert (33,3 %), unreguliert (33,3 %) und vermehrt (33,3 %) exprimiert.

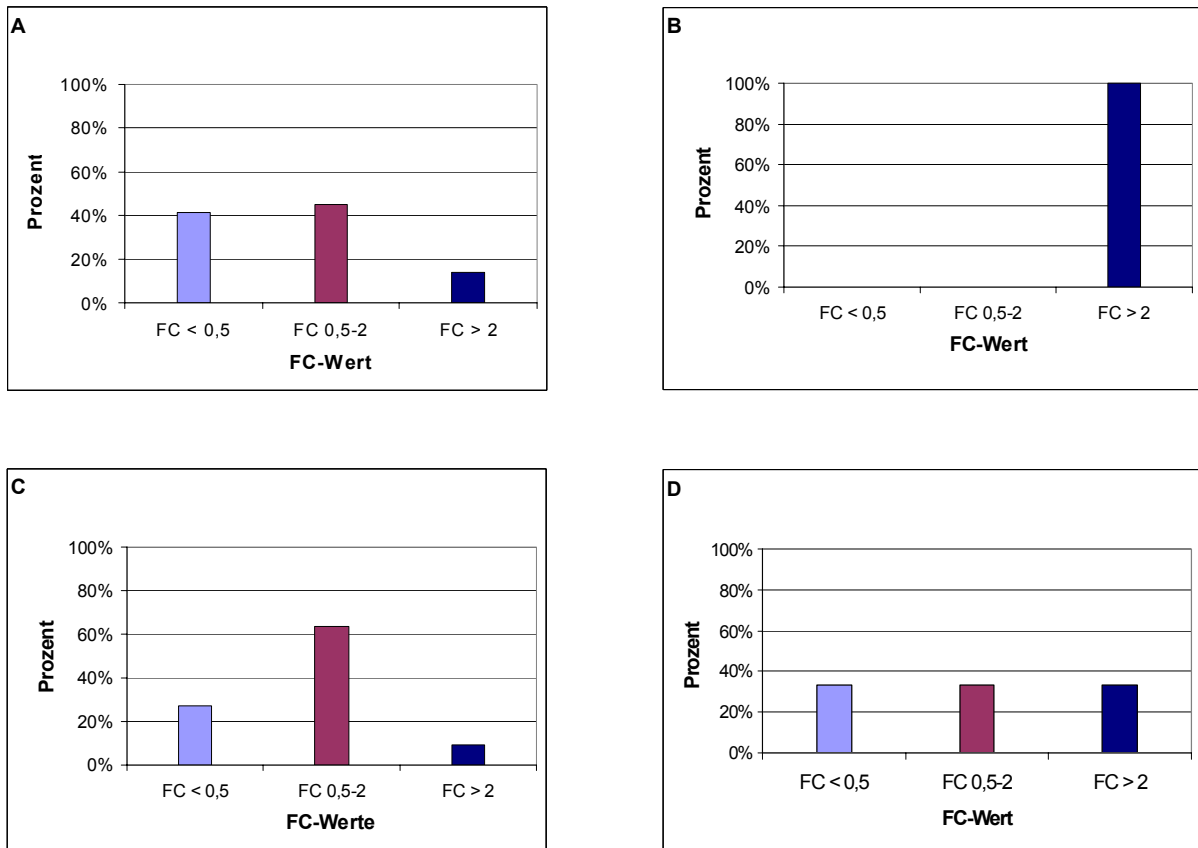


Abbildung 33 Graphische Darstellung der relativen Expression von TGF-beta1 in unterschiedlichen Tumorgruppen:
Diagramm A: Simple Karzinome, **Diagramm B:** Hochmaligne simple Karzinome, **Diagramm C:** Komplexe Karzinome und **Diagramm D:** Adenome.

4.4.2.6.4.3 TGF-beta2

Die relativen Expressionsraten des Einzelgens »TGF-beta2« werden analog der Tumorgruppen (siehe 4.4.2.6.4) in Abbildung 34 (siehe Seite - 69 -) graphisch dargestellt.

Balkendiagramm A: In Diagramm A wird die TGF-beta2-Expression in 29 simplen Karzinomen dargestellt. 72 % der Proben wiesen einen FC-Wert 0,5-2 (unreguliert), 21 % einen FC-Wert > 2 (vermehrt exprimiert) und 7 % einen Wert FC < 0,5 (vermindert exprimiert) auf.

Balkendiagramm B: Bei den hochmalignen simplen Karzinomen war die Expression von TGF-beta2 unreguliert. Der FC-Wert lag bei 100 % der Proben zwischen 0,5 und 2.

Balkendiagramm C: Die TGF-beta2-Expression der 11 Proben der Gruppe komplexe Karzinome siehe Diagramm C ähnelt der der simplen Karzinome (siehe Diagramm A). In 73 % der Proben war die Expression des besprochenen GOI unreguliert (FC-Wert 0,5-2), bei 9 % vermindert exprimiert (FC-Wert < 0,5) und bei 18 % vermehrt (FC-Wert > 2) exprimiert.

Balkendiagramm D: Diagramm D stellt die TGF-beta2-Expression in Adenomen dar. In 33,3 % der Proben war das GOI vermindert exprimiert (FC-Wert < 0,5) und in 66,7 % lag keine Regulation (FC-Wert 0,5-2) vor.

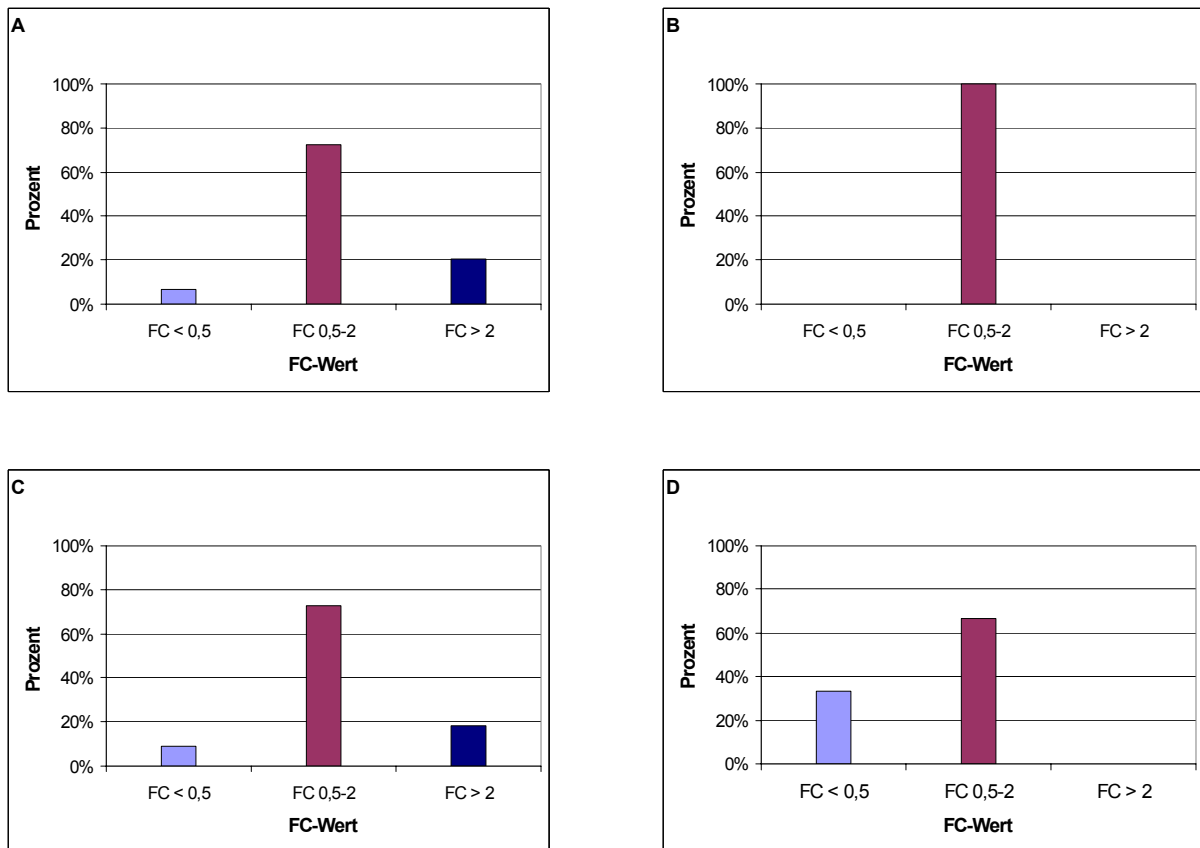


Abbildung 34 Graphische Darstellung der relativen Expression von TGF-beta2 in unterschiedlichen Tumorguppen:
Diagramm A: Simple Karzinome, **Diagramm B:** Hochmaligne simple Karzinome, **Diagramm C:** Komplexe Karzinome und **Diagramm D:** Adenome.

4.4.2.6.4.4 TGF-beta3

Die relativen Expressionsraten des Einzelgens »TGF-beta3« in den oben erwähnten Tumorguppen (siehe 4.4.2.6.4) werden in Abbildung 35 (siehe Seite - 70 -) dargestellt.

Balkendiagramm A: Diagramm A zeigt die relative Expression von TGF-beta3 in 29 simplen Karzinomen (100 %). In 24 % der untersuchten Proben wurde TGF-beta3 vermindert exprimiert (FC-Wert < 0,5). 62 % der Proben wiesen einen FC-Wert zwischen 0,5 und 2 auf, d.h. sie waren unreguliert. In 14 % der Proben war die TGF-beta3-Expression vermehrt (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm B: Das Diagramm B beschreibt die Expression von TGF-beta3 in hochmalignen simplen Karzinomen. Bei beiden der in die qPCR (siehe 3.4.6) eingesetzten Proben war die TGF-beta3-Expression unreguliert (FC-Wert 0,5-2).

Balkendiagramm C: Diagramm C spiegelt die TGF-beta3-Expression in komplexen Karzinomen wider. Zum Einsatz kamen 11 Proben (100 %). In 18 % der Proben war der FC-Wert < 0,5 (verminderte Expression); 46 % der Proben waren in Bezug auf TGF-beta3 unreguliert, 36 % der Proben wiesen jedoch eine erhöhte TGF-beta3-Expression auf (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm D: Diagramm D stellt die TGF-beta3-Expression in Adenomen dar (n = 3). In 33,3 % der Proben war die Expression des GOIs vermindert und in 66,7 % unreguliert.

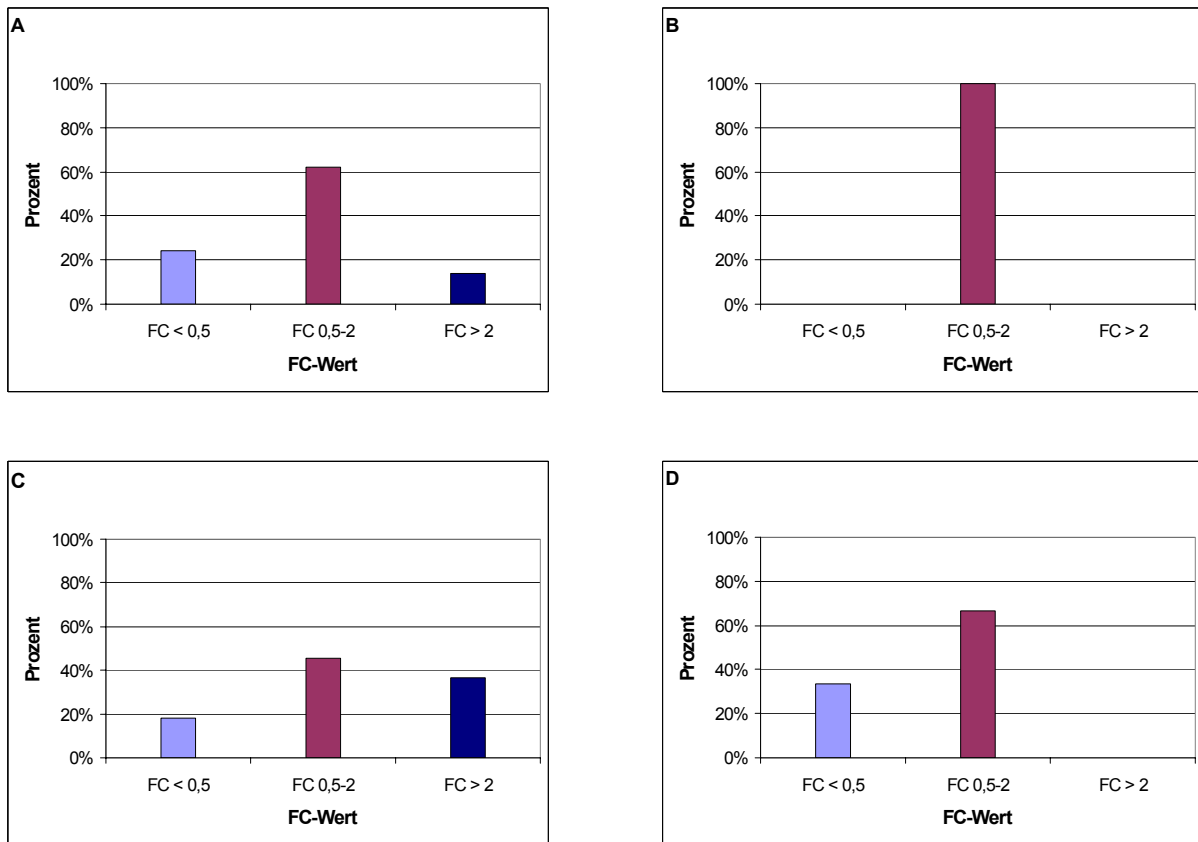


Abbildung 35 Graphische Darstellung der relativen Expression von TGF-beta3 in unterschiedlichen Tumorguppen:
Diagramm A: Simple Karzinome, **Diagramm B:** Hochmaligne simple Karzinome, **Diagramm C:** Komplexe Karzinome und **Diagramm D:** Adenome.

4.4.2.6.4.5 LTBP-1

Die relativen Expressionsraten des GOIs »LTBP-1« sind in Abbildung 36 (siehe Seite - 71 -) graphisch dargestellt.

Balkendiagramm A: Diagramm A stellt die relative Expression von LTBP-1 in 29 simple Karzinome (100 %) dar. In 24 % der untersuchten Proben wurde LTBP-1 vermindert exprimiert (FC-Wert < 0,5). 62 % der Proben wiesen einen FC-Wert zwischen 0,5 und 2 auf, d.h. sie waren unreguliert. In 14 % der Proben war die LTBP-1-Expression vermehrt (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm B: Das Diagramm B zeigt die Expression von LTBP-1 in hochmalignen simplen Karzinomen. Bei beiden der in die qPCR (siehe 3.4.6) eingesetzten Proben war die LTBP-1-Expression vermehrt (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm C: Das Diagramm C spiegelt die LTBP-1-Expression in komplexen Karzinomen wider. Zum Einsatz kamen 11 Proben (100 %). In 27 % der Proben war der

FC-Wert < 0,5 (verminderte LTBP-1-Expression); 73 % der Proben waren in Bezug auf LTBP-1 unreguliert (FC-Wert 0,5-2).

Balkendiagramm D: Das Diagramm D stellt die LTBP-1-Expression in Adenomen (n = 3) dar. In 66,7 % der Proben war die Expression des GOIs unreguliert und in 33,3 % vermehrt.

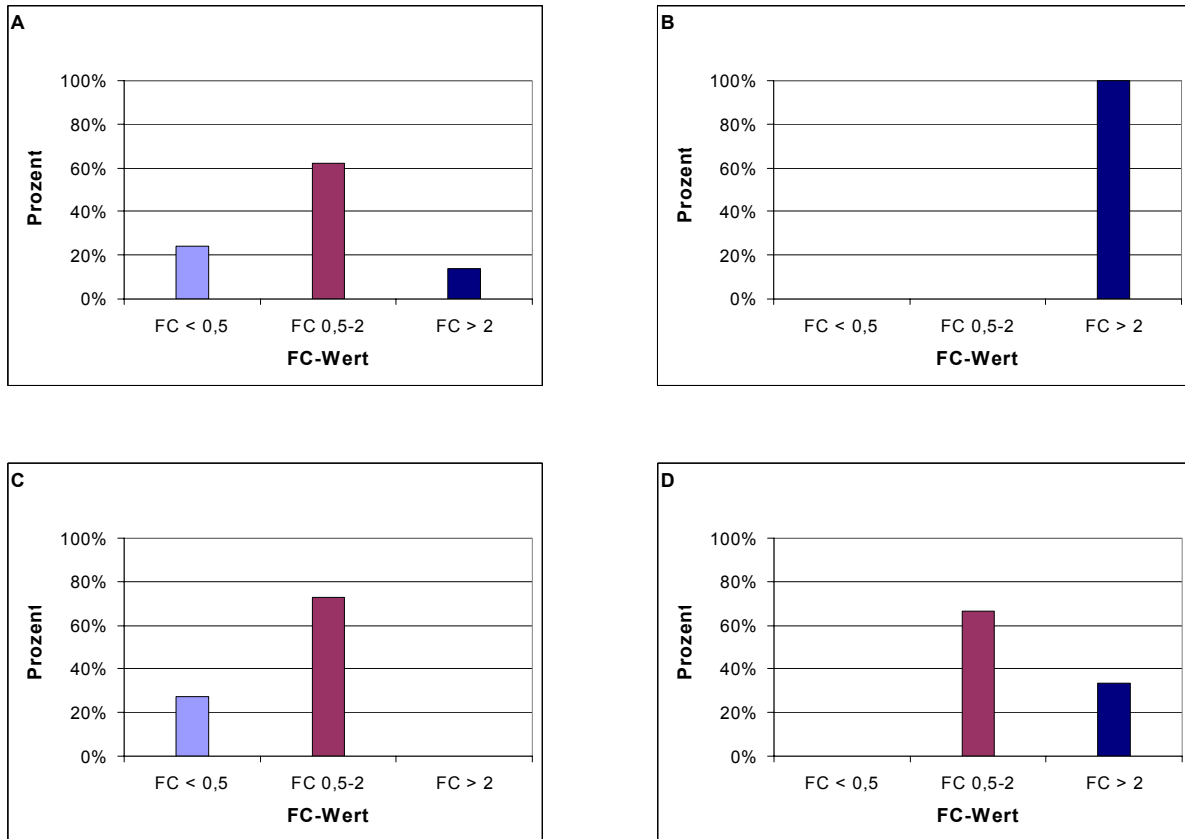


Abbildung 36 Graphische Darstellung der relativen Expression von LTBP-1 in unterschiedlichen Tumorgruppen:
Diagramm A: Simple Karzinome, **Diagramm B:** Hochmaligne simple Karzinome, **Diagramm C:** Komplexe Karzinome und **Diagramm D:** Adenome.

4.4.2.6.4.6 LTBP-3

Die relativen Expressionsraten des Einzelgens »LTBP-3« in den oben erwähnten Tumorgruppen (siehe 4.4.2.6.4) sind in Abbildung 37 (siehe Seite - 72 -) dargestellt.

Balkendiagramm A: Das Diagramm A zeigt die relative Expression von LTBP-3 in 29 simplen Karzinomen (100 %). In 7 % der untersuchten Proben wurde LTBP-3 vermindert exprimiert (FC-Wert < 0,5). 61 % der Proben wiesen einen FC-Wert zwischen 0,5 und 2 auf (keine Regulation der Genexpression). In 32 % der Proben war eine vermehrte LTBP-3-Expression festzustellen (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm B: Das Diagramm B beschreibt die Expression von LTBP-3 in hochmalignen simplen Karzinomen. Bei beiden der in die qPCR (siehe 3.4.6) eingesetzten Proben war die LTBP-3-Expression erhöht (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm C: Das Diagramm C spiegelt die LTBP-3-Expression in komplexen Karzinomen wider. Zum Einsatz kamen 11 Proben (100 %). In 9 % der Proben war der

FC-Wert < 0,5 (verminderte LTBP-3-Expression); 55 % der Proben waren in Bezug auf LTBP-3 unreguliert und 36 % der Proben wiesen eine erhöhte LTBP-3-Expression auf (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm D: Das Diagramm D stellt die LTBP-3-Expression in Adenomen dar (n = 3). Ein Drittel der Proben wies eine verminderte LTBP-3-Expression auf (33,3 %), die anderen zwei Drittel wiesen eine vermehrte Expression des GOIs auf (FC-Wert > 2).

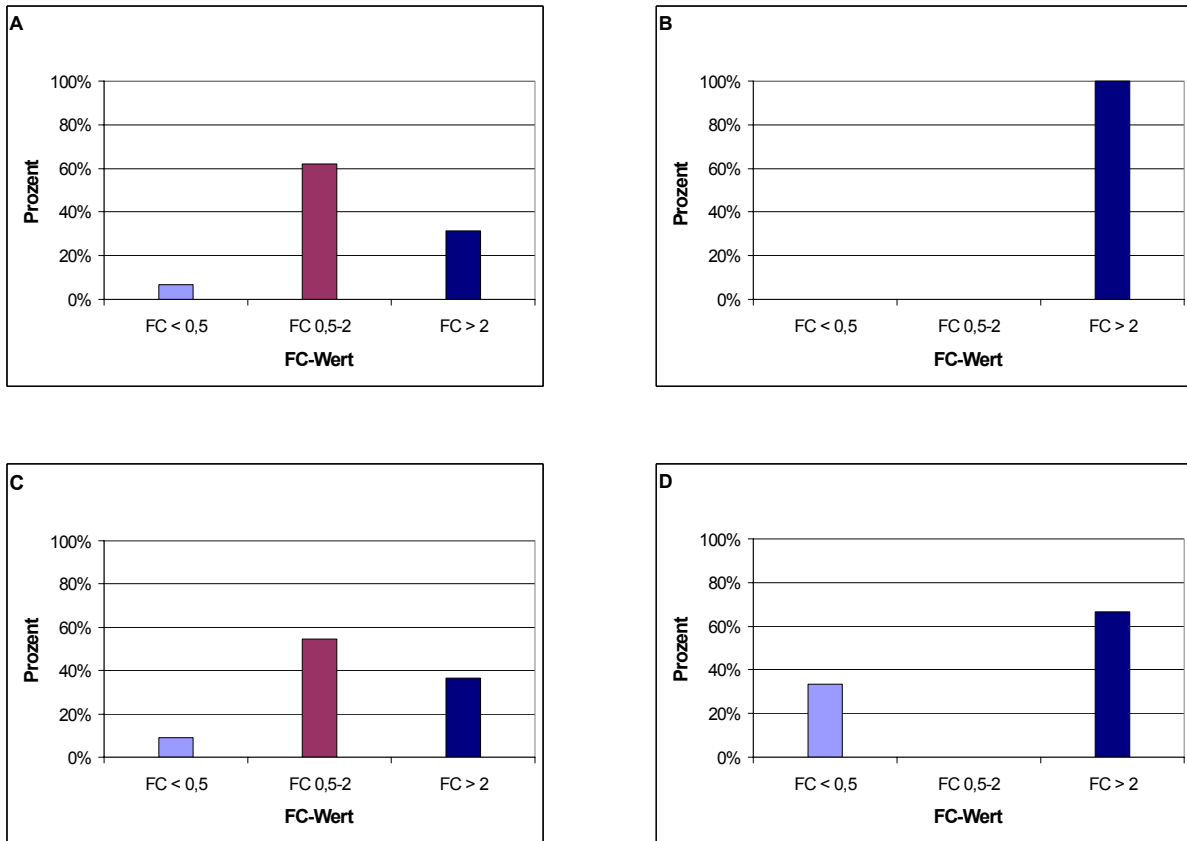


Abbildung 37 Graphische Darstellung der relativen Expression von LTBP-3 in unterschiedlichen Tumorgruppen:
Diagramm A: Simple Karzinome, **Diagramm B:** Hochmaligne simple Karzinome, **Diagramm C:** Komplexe Karzinome und **Diagramm D:** Adenome.

4.4.2.6.4.7 LTBP-4

Die relativen Expressionsraten des Einzelgens »LTBP-4« in den oben erwähnten Tumorgruppen (siehe 4.4.2.6.4) sind in Abbildung 38 (siehe Seite - 73 -) dargestellt.

Balkendiagramm A: Es wurden 29 simple Karzinome (100 %) untersucht. In 78 % der untersuchten Proben wurde LTBP-4 vermindert exprimiert (FC-Wert < 0,5). 19 % der Proben wiesen einen FC-Wert zwischen 0,5 und 2 auf (keine Regulation der Genexpression). In 3 % der Proben war eine vermehrte LTBP-4-Expression festzustellen (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm B: Das Diagramm B beschreibt die Expression von LTBP-4 in hochmalignen simplen Karzinomen. Bei beiden der in die qPCR (siehe 3.4.6) eingesetzten Proben war die LTBP-4-Expression vermindert (FC-Wert < 2).

Balkendiagramm C: Diagramm C spiegelt die LTBP-4-Expression in komplexen Karzinomen wider. Zum Einsatz kamen 11 Proben (100 %). In 82 % der Proben war der FC-Wert < 0,5 (verminderte Expression); 9 % der Proben waren in Bezug auf LTBP-4 unreguliert und 9 % der Proben wiesen eine erhöhte LTBP-4-Expression auf (FC-Wert > 2).

Balkendiagramm D: Das Diagramm D stellt die LTBP-4-Expression in Adenomen dar (n = 3). Ein Drittel der Proben wies eine verminderte Expression des GOIs auf (FC-Wert < 0,5), während die LTBP-4-Expression der anderen Proben unreguliert war (FC-Wert 0,5-2).

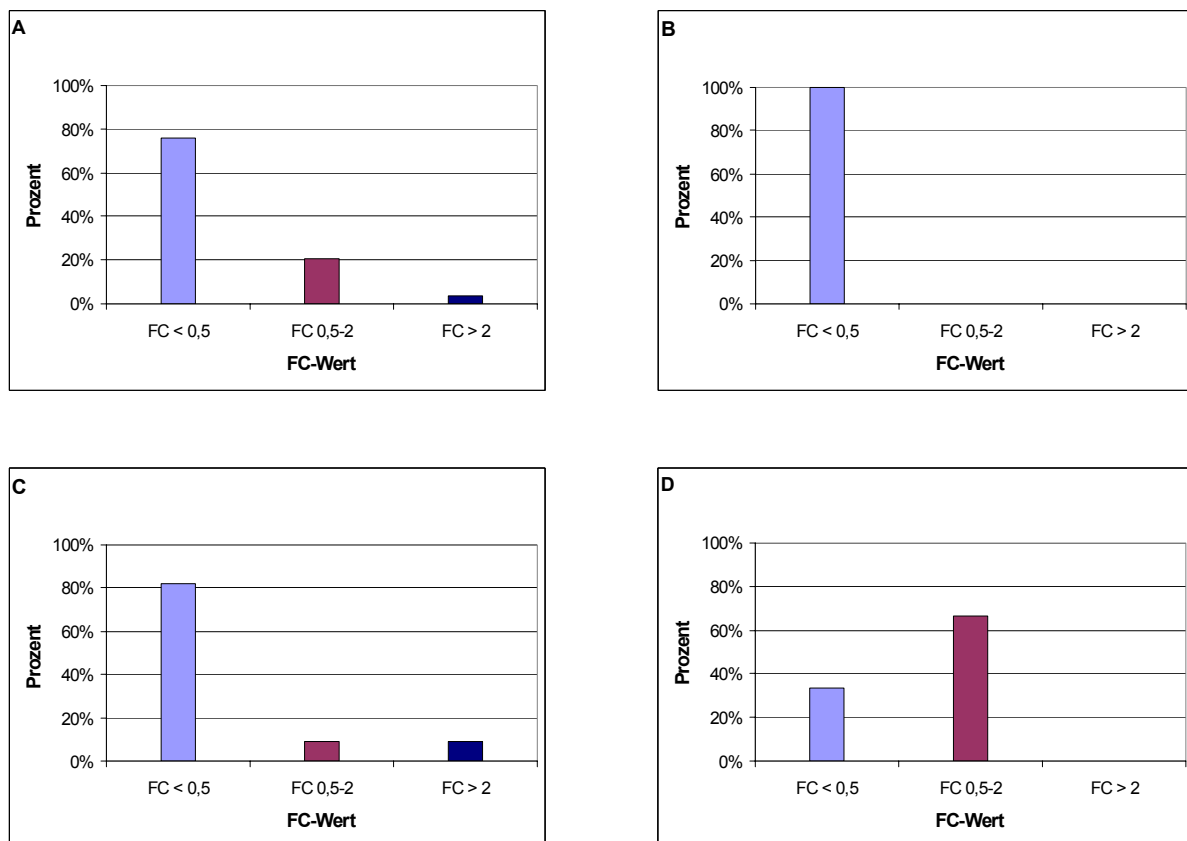


Abbildung 38 Graphische Darstellung der relativen Expression von LTBP-4 in unterschiedlichen Tumorgruppen:
Diagramm A: Simple Karzinome, **Diagramm B:** Hochmaligne simple Karzinome, **Diagramm C:** Komplexe Karzinome und **Diagramm D:** Adenome.

4.4.2.6.5 Relative Expression der GOIs im Gruppenvergleich

Im folgenden Abschnitt wurden die Expressionsraten der einzelnen GOIs einem Gruppenvergleich (Gruppe 1 = simple/hochmaligne simple Karzinome (n = 31) und Gruppe 2 = komplexe Karzinome (n = 11)) mit Hilfe des »U-Tests nach Mann-Whitney« unterzogen. Es wurde die relative Expression von Gen A aus der Gruppe der simplen Karzinome mit der relativen Expression von Gen A aus der Gruppe der komplexen Karzinome stochastisch verglichen.

Der U-Test ist ein nichtparametrischer Vergleich zweier unabhängiger Stichproben (Gruppen). Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass die Verteilung der Lage (Mittelwerte der relativen Expression (FC-Wert)) der GOIs in beiden Gruppen übereinstimmt. Für den Test wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 5\%$ als Signifikanzniveau angenommen. Es wurde von einem signifikanten Ergebnis nach Widerlegung der Nullhypothese ($p < 0,05$) ausgegangen.

Die Durchführung des U-Tests zeigte, dass die Nullhypothese in keinem der Gruppenvergleiche (TGF-beta1-3, LTBP-1, -3 und -4) widerlegt werden konnte. Der »p-Wert« (Signifikanz) aller durchgeführten Tests war größer als 0,05. Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen simple Karzinome und komplexe Karzinome konnten demnach für keines der GOIs nachgewiesen werden. Alle Testergebnisse sind im Anhang aufgeführt (siehe 9.2.2.5).

4.4.2.6.6 Korrelation der Genexpression der GOIs

4.4.2.6.6.1 Einleitung

Um Korrelationen der Genexpression der GOIs (TGF-beta1, 2 und 3 sowie LTBP-1, -3 und -4) in caninen Mammatumoren untereinander zu verifizieren, wurde für jede mögliche »Genvergleichskombination« (Genpaar) eine Kreuztabelle mit n = 40 Proben erstellt. Die 40 Proben entstammen den Gruppen simple Karzinome (n = 29) und komplexe Karzinome (n = 11). Die hochmalignen simplen Karzinome und Adenome wurden ausgeschlossen und gesondert ausgewertet (siehe 4.4.2.6.6.3).

Die Kreuztabellen beinhalten zwei Variablen (relative Expression (FC-Wert) des Gen X und des Gen Y). Das Gen X bildet die Spaltenvariable mit den Merkmalsausprägungen FC-Wert < 0,5, FC-Wert 0,5-2 und FC-Wert > 2. Gen Y ist die Zeilenvariable und beinhaltet die gleichen Merkmalausprägungen wie Gen X (siehe BeispielTabelle 15, Seite - 75 -).

Tabelle 15 Kreuztabelle des Genpaares TGF-beta1 und TGF-beta2

		TGF-Beta 2 Tumor			Gesamt		
		< 0.5	0.5 - 2	>2			
TGF-Beta1 Tumor	< 0.5	Anzahl	1	13	1	15	
		Erwartete Anzahl	1,1	10,9	3,0	15,0	
		% von TGF-Beta1 Tumor	6,7%	86,7%	6,7%	100,0%	
		% von TGF-Beta 2 Tumor	33,3%	44,8%	12,5%	37,5%	
		% der Gesamtzahl	2,5%	32,5%	2,5%	37,5%	
		Standardisierte Residuen	-,1	,6	-1,2		
		0.5 - 2	Anzahl	1	16	3	20
		Erwartete Anzahl	1,5	14,5	4,0	20,0	
		% von TGF-Beta1 Tumor	5,0%	80,0%	15,0%	100,0%	
		% von TGF-Beta 2 Tumor	33,3%	55,2%	37,5%	50,0%	
		% der Gesamtzahl	2,5%	40,0%	7,5%	50,0%	
		Standardisierte Residuen	-,4	,4	-,5		
		>2	Anzahl	1	0	4	5
		Erwartete Anzahl	,4	3,6	1,0	5,0	
		% von TGF-Beta1 Tumor	20,0%	,0%	80,0%	100,0%	
	% von TGF-Beta 2 Tumor	33,3%	,0%	50,0%	12,5%		
	% der Gesamtzahl	2,5%	,0%	10,0%	12,5%		
	Standardisierte Residuen	1,0	-1,9	3,0			
Gesamt	Anzahl	3	29	8	40		
	Erwartete Anzahl	3,0	29,0	8,0	40,0		
	% von TGF-Beta1 Tumor	7,5%	72,5%	20,0%	100,0%		
	% von TGF-Beta 2 Tumor	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		
	% der Gesamtzahl	7,5%	72,5%	20,0%	100,0%		

TGF-beta1 = Zeilenvariable
TGF-beta2 = Spaltenvariable

Um gegebenenfalls bestehende Abhängigkeiten bezüglich der Genexpression zweier Gene statistisch zu berechnen, wurde ein nichtparametrischer Test zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben, der »Chi-Quadrat-Test nach Pearson« (χ^2 -Test), vorgenommen. Dieser Test wurde als Unabhängigkeitstest zweier Merkmale (relative Expression von Gen X und Gen Y) durchgeführt. Die Berechnung des »Chi-Quadrat-Wertes« erfolgt anhand der Gleichung nach *Pearson*:

Gleichung 6

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

Die Nullhypothese (H_0) sagt aus, dass das Merkmal X (relative Genexpression des Gen X) von dem Merkmal Y (relative Genexpression des Gen Y) stochastisch (statistisch) unabhängig ist. Zwei Variablen einer Kreuztabelle gelten dann als voneinander unabhängig, wenn die beobachteten Häufigkeiten (f_o) der einzelnen Zeilen mit den erwarteten Häufigkeiten (f_e) übereinstimmen. Aus der Differenz der Häufigkeiten (f_e) und (f_o) werden sogenannte standardisierte Residuen berechnet (Bühl and Zöfel 2000). Die Ermittlung einer Expressionsabhängigkeit zweier verglichener Gene bezieht sich auf standardisierte Residuen. Residuen sind "Restwerte". Unter Residuum versteht man die Differenz zwischen geschätztem Wert (Wert, den das Modell liefert) und empirischem Wert. Es ist der Anteil der Variabilität (Varianz), der durch ein gegebenes Modell nicht erklärt werden kann (siehe Kreuztabellen unter 9.2.2.5). Für den χ^2 -Test wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 5\%$ als Signifikanzniveau angenommen. Ein signifikantes Ergebnis (statistische Abhängigkeit) liegt bei Ablehnung der Nullhypothese vor, wenn $p < 0,05$ ist, d.h. wenn Zellen mit standardisierte Residuen > 2 als auffällig interpretiert werden. Die Kreuztabellen für alle durchgeführten Genkombinationen sind im Anhang (siehe 9.2.2.5.1) eingefügt.

4.4.2.6.6.2 Korrelation der relativen Expression der GOIs in simplen Karzinomen und komplexen Karzinomen

Die statistischen Untersuchungen ergaben signifikante Ergebnisse für die Korrelation der Genexpression folgender Genpaare:

TGF-beta1 und TGF-beta2, TGF-beta1 und LTBP-3, TGF-beta1 und LTBP-4, TGF-beta2 und LTBP-3, TGF-beta2 und LTBP-4, TGF-beta3 und LTBP-4, LTBP-1 und LTBP-4 sowie LTBP-3 und LTBP-4.

Zur graphischen Veranschaulichung der Kreuzdiagramme, aus denen sich signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) ergaben, wurden Balkendiagramme (z. T. mit unterschiedlicher Skalierung) erstellt (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40, siehe Seite - 77 - und - 78 -).

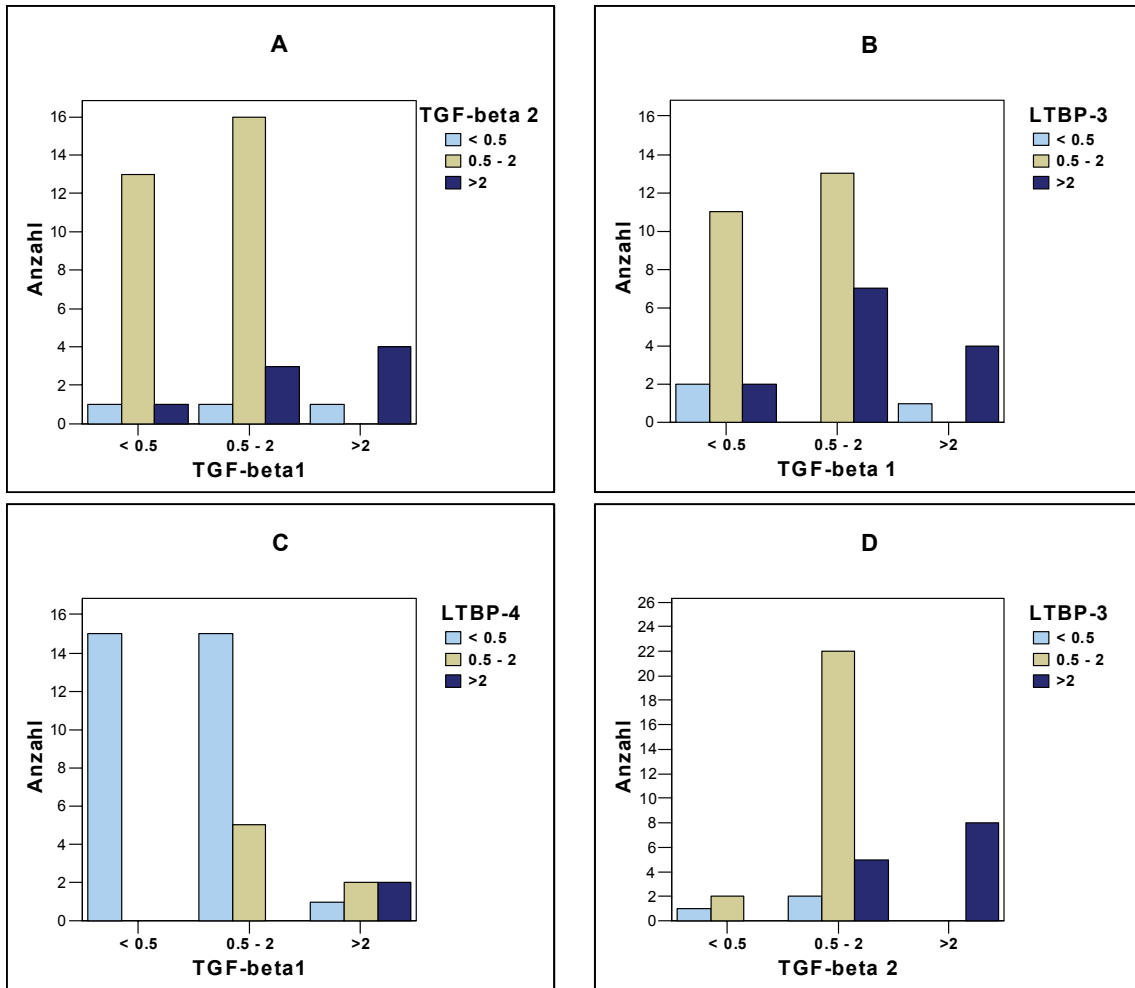


Abbildung 39 Graphische Darstellung der Korrelation der Genexpression von TGF-beta1 und TGF-beta2 (siehe A), von TGF-beta1 und LTBP-3 (siehe B), von TGF-beta1 und LTBP-4 (siehe C) und von TGF-beta2 und LTBP-3 (siehe D)

Balkendiagramm A: Im Diagramm A wird die Korrelation der Genexpression von TGF-beta1 und TGF-beta2 dargestellt. Die Kreuztabelle (siehe Anhang 9.2.2.5.1, Tabelle 41) weist hohe standardisierte Residuen für die Merkmalsausprägung FC-Wert > 2 der Zeilenvariable TGF-beta1 und der Ausprägung FC-Wert 0,5 – 2 sowie FC-Wert > 2 der Spaltenvariante TGF-beta2 (siehe 9.2.2.5.1, Tabelle 41) auf. Übertragen auf das Balkendiagramm A wurde statistisch erwartet, dass bei einer vermehrten Expression von TGF-beta1 in (n) Proben (1.) eine größere Anzahl in der Expression von TGF-beta2 unreguliert ist bzw. (2.) die Häufigkeit (f_0) der Proben, in denen TGF-beta2 vermehrt exprimiert wurde, geringer ist.

Balkendiagramm B: Im Diagramm B wird die Korrelation der Genexpression von TGF-beta1 und LTBP-3 dargestellt. Hohe standardisierte Residuen ergaben sich hier für die Merkmalsausprägung FC-Wert > 2 der Zeilenvariable TGF-beta1 und der Ausprägung FC-Wert 0,5 – 2 sowie FC-Wert > 2 der Spaltenvariante LTBP-3 (siehe 9.2.2.5.1, Tabelle 44). Übertragen auf das Balkendiagramm B wurde erwartet (f_e), dass bei einer vermehrten Expression von TGF-beta1 in (n) Proben (1.) die Expression von LTBP-3 in höherem Maße

unreguliert ist bzw. (2.) die Anzahl an Proben (f_0), in denen LTBP-3 vermehrt exprimiert wurde, geringer ist.

Balkendiagramm C: Diagramm C stellt die Korrelation der Genexpression von TGF-beta1 und LTBP-4 graphisch dar. Hohe standardisierte Residuen wurden für die Merkmalsausprägung FC-Wert > 2 der Zeilen- (TGF-beta1) und Spaltenvariable (LTBP-4) ermittelt (siehe 9.2.2.5.1, Tabelle 45). In diesem Expressionsvergleich wurde statistisch von einer niedrigeren Anzahl an Proben (f_e) ausgegangen, in denen sowohl die Expression von TGF-beta1 als auch von LTBP-4 vermehrt ist.

Balkendiagramm D: Diagramm D veranschaulicht die Korrelation der Expression von TGF-beta2 und LTBP-3. Hohe standardisierte Residuen wurden für die Merkmalsausprägung der Zeilenvariable TGF-beta2 mit dem FC-Wert > 2 und für die Merkmalsausprägung der Spaltenvariablen LTBP-3 bei dem FC-Wert 0,5-2 und FC-Wert > 2 ermittelt (siehe 9.2.2.5.1, Tabelle 48). Im Fall der vermehrten TGF-beta2-Expression wird eine höhere Probenanzahl erwartet (f_e), bei denen die LTBP-3-Expression unreguliert ist und eine geringere Anzahl (f_e), bei denen LTBP-3 vermehrt exprimiert wird.

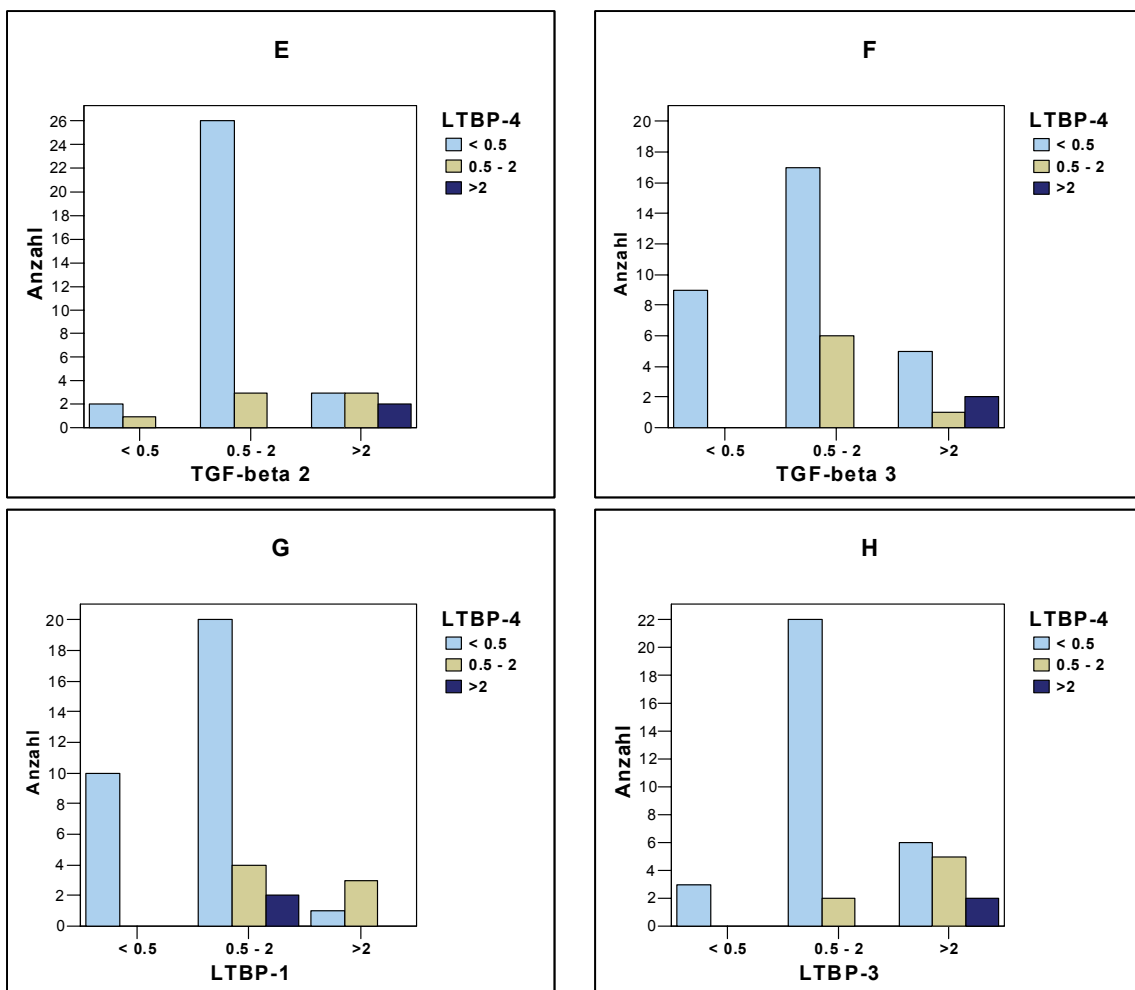


Abbildung 40 Graphische Darstellung der Korrelation der Genexpression von TGF-beta2 und LTBP-4 (siehe E), von TGF-beta3 und LTBP-4 (siehe F), von LTBP-1 und LTBP-4 (siehe G) und von LTBP-3 und LTBP-4 (siehe H)

Balkendiagramm E: Diagramm E zeigt die Korrelation der Expression von TGF-beta2 und LTBP-4. Die Kreuztabelle (siehe Anhang 9.2.2.5.1, Tabelle 49) weist hohe standardisierte Residuen in der Zeilenvariablen TGF-beta2 und in der Spaltenvariablen LTBP-4 mit der Merkmalsausprägung FC-Wert > 2 auf. Die Anzahl der Proben (beobachtete Häufigkeit (f_0)), bei denen die Expression von TGF-beta2 und LTBP-4 gleichzeitig vermehrt (FC-Wert > 2) war, war größer/höher als erwartet (f_e).

Balkendiagramm F: Diagramm F veranschaulicht die Korrelation der Expression von TGF-beta3 und LTBP-4. Die Kreuztabelle (siehe Anhang 9.2.2.5.1, Tabelle 52) zeigt hohe standardisierte Residuen in der Zeilenvariablen TGF-beta3 und in der Spaltenvariablen LTBP-4 für die Merkmalsausprägung FC-Wert > 2. Die Anzahl der Proben (f_0), bei denen die Expression von TGF-beta3 und LTBP-4 gleichzeitig vermehrt (FC-Wert > 2) war, war größer als erwartet (f_e).

Balkendiagramm G: Diagramm G veranschaulicht die Korrelation der Expression von LTBP-1 und LTBP-4. Die Kreuztabelle weist hohe standardisierte Residuen in der Zeilenvariablen LTBP-1 für die Merkmalsausprägung FC-Wert > 2 und in der Spaltenvariable LTBP-4 für die Merkmalsausprägung FC-Wert 0,5-2 auf. Die Anzahl der Proben (beobachtete Häufigkeit (f_0)), bei denen die Expression von LTBP-1 vermehrt und für LTBP-4 gleichzeitig unreguliert war, war größer/höher als erwartet (f_e).

Balkendiagramm H: Diagramm H zeigt die Korrelation der Expression von LTBP-3 und LTBP-4. Die Kreuztabelle zeigt hohe standardisierte Residuen für die Merkmalsausprägungen FC-Wert > 2 von LTBP-3 und FC-Wert 0,5-2 von LTBP-4 sowie für die Merkmalsausprägung FC-Wert > 2 von LTBP-3 und FC-Wert > 2 von LTBP-4. Es wurde jeweils von einer geringeren Anzahl (f_e) ausgegangen.

4.4.2.6.6.3 Korrelation der relativen Expression der GOIs in hochmalignen simplen Karzinomen und Adenomen

Im vorherigen Abschnitt wurde die Korrelation der Genexpression der GOIs in simplen Karzinomen und komplexen Karzinomen untersucht. Zur Darstellung potentieller Genexpressionskorrelationen in hochmalignen simplen Karzinomen (n = 2) und Adenomen (n = 3) wurden aufgrund geringerer Probenzahlen mehrfache Liniendiagramme mit Hilfe des Programms »SPSS 12.0 für Windows« erstellt.

In den Diagrammen kann das Expressionsmuster der Targetgene pro Fall (Patho-ID) abgelesen werden. Die FC-Werte können im Anhang unter 9.2.2.4 nachvollzogen werden (siehe Tabelle 32 und Tabelle 34).

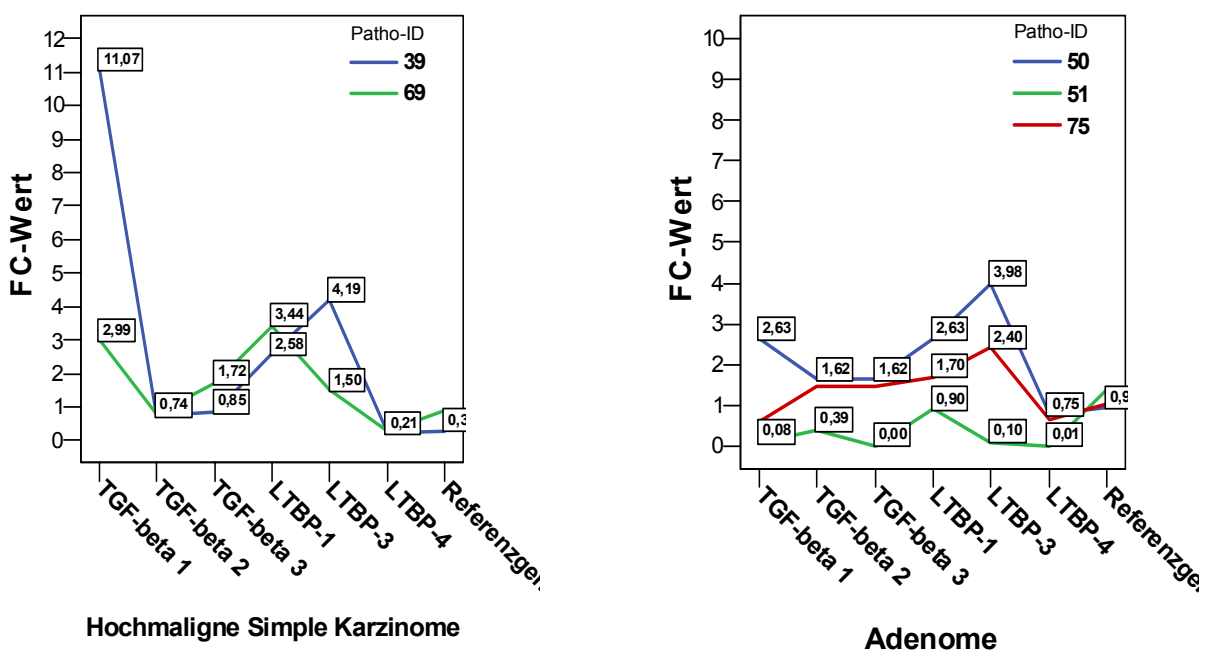


Abbildung 41 Korrelation der Genexpression der GOIs in hochmalignen simplen Karzinomen (links) und Adenomen (rechts)

Im Expressionsvergleich der GOIs in hochmalignen simplen Karzinome (siehe Abbildung 41, linkes Liniendiagramm) liegt in beiden Fällen (Patho-ID 39 und 69) eine vermehrte Expression von TGF-beta1 und LTBP-1 vor. Die Expression der Targetgene TGF-beta2 und TGF-beta3 ist unreguliert. Die LTBP-3-Expression ist nur im Tumor 69 vermehrt. LTBP-4 wird in beiden Tumoren vermindert exprimiert.

Das rechte Diagramm der Abbildung 41 zeigt die Analyse der Proben von drei Adenomen. Sie weisen ein stark abweichendes Expressionsmuster der GOIs auf. Der Fall 50 zeigt eine vermehrte Expression von TGF-beta1, LTBP-1 und LTBP-3. Die anderen GOIs sind unreguliert. Des Weiteren sind im Fall 51 alle GOIs vermindert exprimiert. Nummer 75 zeigt eine verminderte Expression an TGF-beta1 und eine vermehrte Expression an LTBP-3; die anderen Targetgene sind unreguliert.

4.4.2.6.7 Relative Expression der GOIs bei primärer Multiplizität

Mammatumore der Hündin entstehen häufig primär multipel (primäre Multiplizität, siehe Literaturteil unter 2.2.1). Sie unterscheiden sich zudem oft in ihrer histopathologischen Klassifizierung (siehe WHO-Klassifizierung unter 3.3.2). Um in den Fällen (Patho-ID = Fallnummer), bei denen mehrere Mammatumore auftraten (gekennzeichnet durch unterschiedlich farbige Linien), Vergleiche des Expressionsmusters der Targetgene anstellen zu können, wurden mehrfache Liniendiagramme mit dem Programm »SPSS 12.0 für Windows« erstellt (siehe Abbildung 42 und Abbildung 43). Die FC-Werte können dem Anhang entnommen werden (siehe 9.2.2.4).

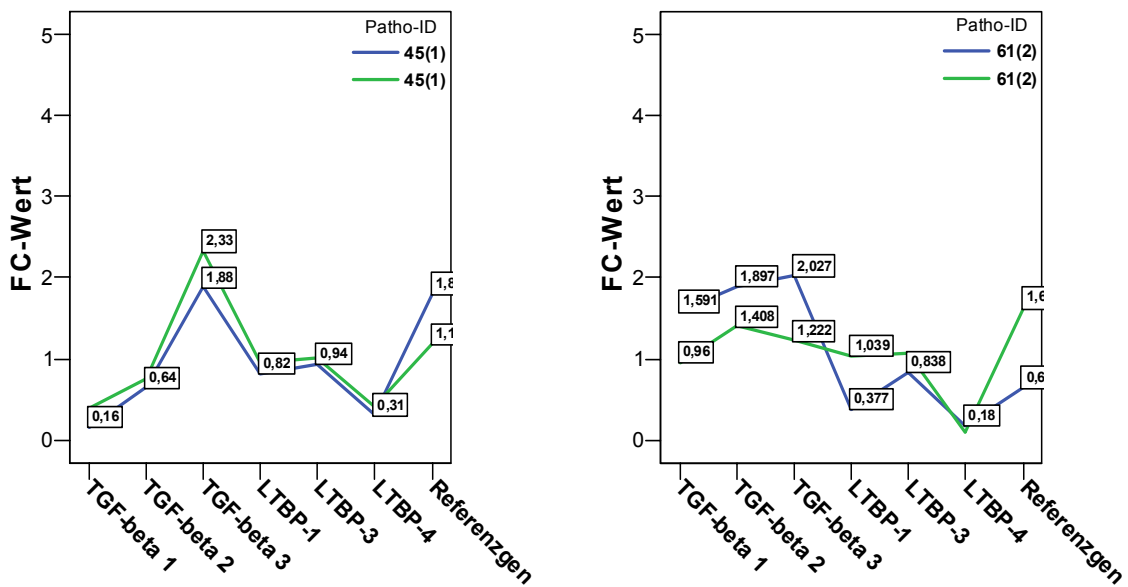


Abbildung 42 Linkes Diagramm-Patho-ID 45: Expressionsmuster der GOIs in zwei simplen Karzinomen (1)
 Rechtes Diagramm-Patho-ID 61: Expressionsmuster der GOIs in zwei komplexen Karzinomen (2)

Im linken Diagramm der Abbildung 42 wird das Expressionsmuster der GOIs in zwei verschiedenen simplen Karzinomen dargestellt, die jedoch der gleichen Mammaleiste entnommen wurden. Hier zeigt sich im Gegensatz zum rechten Diagramm, in dem zwei komplexe Karzinome (ebenfalls aus derselben Mammaleiste entnommen) dargestellt werden, ein relativ gleichmäßiges Expressionsmuster aller Targetgene. Der Expressionsvergleich der komplexen Karzinome weist eine Übereinstimmung der Expression von LTBP-4 (FC-Wert < 0,5) auf.

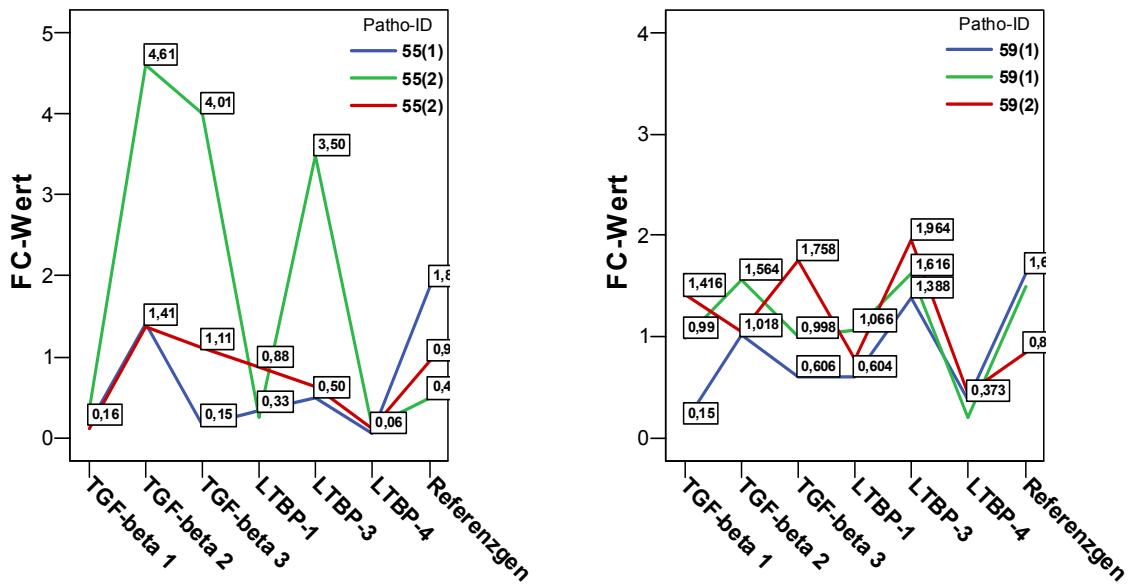


Abbildung 43 Linkes Diagramm-Patho-ID 55: Expressionsmuster der GOs in drei unterschiedlichen Tumoren einer Mammaleiste: Ein simples Karzinom (1) und zwei komplexe Karzinome (2)
 Rechtes Diagramm-Patho-ID 59: Expressionsmuster der GOs in drei unterschiedlichen Tumoren einer Mammaleiste: Zwei simple Karzinome (1) und ein komplexes Karzinom (2)

Das linke Diagramm der Abbildung 43 stellt den Vergleich des Expressionsmusters zweier komplexer Karzinome und eines simplen Karzinoms dar. Alle drei Tumore weisen einheitlich eine verminderte Expression von TGF-beta1 und LTBP-4 auf. Die Expression der anderen GOs zeigt sich ungleichmäßig reguliert.

Das rechte Diagramm der Abbildung 43 stellt das Expressionsmuster zweier simpler Karzinome und eines komplexen Karzinoms dar. Die relative Expression der GOs in den simplen Karzinomen ist relativ gleichmäßig. Das Expressionsmuster der GOs im komplexen Karzinom divergiert von dem der simplen Karzinome. Alle drei Tumore weisen eine verminderte Expression von LTBP-4 auf.