

5 DISKUSSION

Tumore der Gesäugeleiste gehören nach den Hauttumoren zu den am häufigsten auftretenden neoplastischen Erkrankungen bei Hunden. Sie stellen für die weibliche Population die Tumorart mit der höchsten Prävalenz dar (Nolte and Nolte 2000; Dobson, Samuel et al. 2002).

Pathogenetisch handelt es sich bei Mammatumoren um ein multifaktorielles Geschehen (Gutberlet, Wey et al. 1998). Ursächlich sind hierfür unter anderem genetische Mutationen, die durch exogene oder auch durch endogene Faktoren bedingt werden.

Zu den exogenen Faktoren zählen chemische, physikalische, infektiöse oder virale Noxen, bei den endogenen Faktoren sind besonders Geschlecht, familiäre und individuelle Prädispositionen als auch das Alter maßgebend (Misdorp 1991).

Eine maligne neoplastische Geschwulst kann auf zellulärer Ebene durch seine Unabhängigkeit von physiologischen Wachstumssignalen, Resistenz gegen Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion, uneingeschränkte Teilungsfähigkeit (Mitoserate), Angiogeneseinduktion, Invasivität und Metastasierungsfähigkeit charakterisiert werden (Reinacher 2002). Auf molekularer Ebene wird die Steuerung dieser Eigenschaften von unterschiedlichen Regulatoren übernommen. Dazu gehören z.B. Tumorsuppressorgene, Onkogene, Reparaturgene und das Immunsystem.

Um den oben genannten exogenen und endogenen Noxen therapeutisch besser begegnen zu können, sind vor allem Untersuchungen des komplexen molekulargenetischen Pathomechanismus von Mammatumoren derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand erstens in der Aufnahme von klinischen Daten (Geschlecht, Alter, Rasse und Kastrationsstatus) der an Mammatumoren erkrankten Hunde unter Berücksichtigung des Einzelindividuums, zweitens in der morphologischen Klassifizierung der entnommenen Tumore und drittens in der molekulargenetischen Analyse der Tumorsuppressorgene TGF-beta1, 2 und 3 als auch LTBP-1, -3 und -4 mittels qRT-PCR in unterschiedlichen Typen caniner Mammatumoren.

Bei den 31 untersuchten Tieren handelte es sich ausschließlich um Hündinnen. Dies deckt sich mit den Angaben zahlreicher Autoren (Brodey, Goldschmidt et al. 1983; Ruttemann 2001), die die Prävalenz von Rüden an caninen Mammatumoren zu erkranken, mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 1 % oder zwischen 0,4 und 2,7 % (Frolik, Dart et al. 1983; Bostedt 1994) einschätzen. Die seltenen Mammatumore beim Rüden werden hauptsächlich im Zusammenhang mit östrogenproduzierenden Hodentumoren und einem damit einhergehenden Feminisierungssyndrom beobachtet (Brodey, Goldschmidt et al. 1983; Misdorp 1988; Moulton 1990; Gutberlet, Wey et al. 1998; Ruttemann 2001).

Insgesamt wurden 11 Hunderassen in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen. Mischlingshunde waren mit 44 % (14 Tiere) ungeachtet der Dignität am häufigsten von Mammatumoren betroffen, gefolgt von Terriern mit 13 % (4 Tiere), Teckeln mit 13 % (4 Tiere) und Pudeln mit 9 % (3 Tiere). Ferner waren einzelne Hündinnen der Rassen Mittelschnauzer, Bernersennenhund, Cocker-Spaniel, Golden Retriever, Labrador, Epagneul Breton und Chihuahua vertreten. Eine allgemeingültige Aussage über die Rassenverteilung der in der Untersuchung von Mammatumoren betroffenen Hunde ließ sich nicht treffen. Der Hauptgrund war das Fehlen adäquater Zensusdaten die Population betreffend. Somit können die Prävalenzdaten hinsichtlich der Rasse nicht in Relation zur Gesamtheit der Hunde einer definierten Region gesetzt werden. Die in der Literatur aufgeführten Angaben zu Rassedispositionen können immer im Hinblick auf fehlende Zensusdaten teilweise bestätigt werden. Die Literaturhinweise beziehen sich teilweise auf Rassehunde (Dorn, Taylor et al. 1968) und teilweise auf Mischlingshunde (Fidler and Brodey 1967). Übereinstimmend mit der Literatur konnte gezeigt werden, dass neben den Mischlingshunden besonders Terrier (Dahme and Weiss 1958; Busch 1993; Gutberlet 1994), Teckel (Sandersleben 1968; Mitchell, De la Iglesia et al. 1974; Simon, P. Goronzy et al. 1996) und Pudel (Mitchell, De la Iglesia et al. 1974) prädisponiert sind. Einige Autoren halten den Boxer für prädisponiert (Moe 2001; Kessler 2005). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen (Juni 2005 – April 2006) wurde kein Boxer mit einem Mammatumor vorgestellt, so dass die angedeutete Disposition nicht bestätigt werden kann. Die Auswertung der eigenen Daten weist im Vergleich zu den Literaturangaben auf erhöhte Erkrankungstendenzen einzelner Rassen (wie z. B. von Mischlingshunden, Terrier und Teckel) hin. Sie zeigt aber auch, dass eindeutige Voraussagen zur Prädisposition einzelner Rassen nur mit Hilfe bekannter Populationsdaten (Zensusdaten) und hohen Probandenzahlen gemacht werden können.

Das Alter der Probandentiere (n = 31) betrug sieben bis zwölf Jahre. Das Alter von 18 der Probandinnen lag zwischen sieben und zehn Jahren. 13 der Tiere gehörten in die Altersklasse über zehn Jahre. Das Durchschnittsalter der Tiere zum präoperativen Zeitpunkt betrug 9,5 Jahre und deckt sich mit zahlreichen Angaben aus der Literatur (Busch 1993; Gutberlet 1994; Bostedt and Tammer 1995; Simon, P. Goronzy et al. 1996). Die Frage nach dem erstmaligen Auftreten des Tumorleidens konnte hier nicht geklärt werden. Als am stärksten repräsentierte Gruppe konnten die acht- bis zwölfjährigen Patientinnen definiert werden. Bemerkenswert ist, dass große Rassen im Normalfall nicht das Alter erreichen wie kleine Rassen. Sie erkrankten jedoch wie kleinwüchsige Hunde erst ab dem siebten Lebensjahr. Diese Ergebnisse bestätigen die Beschreibung der Krankheit als Altersleiden bei Hunden (Bostedt and Tammer 1995).

Der mit 90,3 % sehr hohe Anteil an unkastrierten erkrankten und der mit 9,7 % geringe Anteil an kastrierten erkrankten Tieren weist deutlich daraufhin, dass die frühe Kastration (vor und nach der ersten Läufigkeit) einen präventiven Effekt auf die Entstehung von Mammatumoren hat. Dies zeigt sich ebenfalls an den kastrierten von Mammatumoren betroffenen Hündinnen, die spät im Alter von sechs und acht Jahren ovariohysterektomiert wurden.

Eine routinemäßige Frühkastration von Hündinnen, die nicht zur Zucht eingesetzt werden sollen, ist dennoch kritisch zu betrachten. Zum einen handelt es sich um einen massiven Eingriff in das Recht eines Geschöpfes auf Unversehrtheit. Das zuletzt Genannte wird durch das Tierschutzgesetz (Neufassung vom 18. Mai 2006, BGBl. I S. 1207) untermauert. In dem Tierschutzgesetz legt der Gesetzgeber im vierten Abschnitt § 6 / Abs.1 fest: »Verboten ist das vollständige oder teilweise Amputieren von Körperteilen oder das vollständige oder teilweise Entnehmen oder Zerstören von Organen oder Geweben eines Wirbeltieres. Dieses Gebot gilt nicht, wenn der Eingriff im Einzelfall nach tierärztlicher Indikation geboten ist«. Zum einen kann die Frühkastration als Präventionsmaßnahme gegen canine Mammatumoren als medizinische Indikation angesehen werden. Jedoch sollte diesem Aspekt die gesundheitlichen und ethologischen Auswirkungen einer Ovariektomie bzw. Ovariohysterektomie gegenübergestellt werden. Folgen einer verfrühten Kastration können sich unter anderem in einem verzögerten Epiphysenfugenschluss, in Harninkontinenz, mangelhafter Entwicklung der äußeren Geschlechtsorgane und in der Beibehaltung juveniler Verhaltensweisen äußern (Heidenberger and Unshelm 1990; Okkens, Kooistra et al. 1997; Reichler, Pfeiffer et al. 2004).

Die Verteilung der Mammatumore in der Gesäugeleiste entspricht im Wesentlichen den Aussagen der Literatur. Übereinstimmend mit den Angaben wurde in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der Tumorfrequenz von kranial nach kaudal vernommen (Fidler and Brodey 1967; Mitchell, De la Iglesia et al. 1974; Mulligan 1975; Ferguson 1985; Moulton, Rosenblatt et al. 1986).

Das vermehrte Auftreten der Mammatumore in den hinteren Komplexen ist möglicherweise auf eine erhöhte Milchproduktion und dem damit verbundenen massiveren Auf- und Abbau des Gewebes der Milchdrüse zurückzuführen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten 45 Mammatumore von 31 Hündinnen untersucht werden. Die pathohistologischen Diagnosen wurden im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin gestellt. Die Proben (Kontroll- und Testprobe) wurden anschließend an eine durchgeführte Mastektomie aus den Mammaleisten entnommen. Das Exzisionsgebiet musste für die vorliegende Arbeit nicht erweitert werden. Zur Entnahme von Drüsengewebe konnten sowohl neoplastische als auch nichneoplastische Proben (unverändertes Drüsengewebe der Mamma) aus der zuvor extirpierten Mammaleiste entfernt

werden. Die beschriebene Probenentnahme bot ferner den Vorteil, *in vivo*-Untersuchungen unter Umgehung von Tierversuchen durchzuführen. Ein Teil der Proben wurde für die pathohistologische Klassifizierung in Paraffin eingebettet, der verbleibende Teil wurde in ein Stabilisierungsmedium (RNA-Later) für molekularbiologische Untersuchungen überführt.

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen der Targetgene (TGF-beta1, 2 und 3 sowie LTBP-1, -3 und -4) stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, darunter Northern Blot und quantitative Polymerasekettenreaktion (Sambrook, Fritsch et al. 1989; Bustin 2000). Von diesen wurde die qRT-PCR in den vergangenen Jahren als *state of the art*-Verfahren etabliert. Obwohl keine absolute Quantifizierung erfolgt, besteht ein wesentlicher Vorteil dieser Methode darin, dass nicht nur eine relative Quantifizierung möglich ist, sondern parallel dazu auch ein qualitativer Nachweis spezifischer Zielgene erbracht wird. Dadurch können Arbeitsschritte wie die Durchführung einer konventionellen PCR einschließlich kPCR-spezifischer Primerplanung und -synthese eingespart werden. Die qRT-PCR ist somit der überlegene methodische Versuchsansatz und wurde daher in der vorliegenden Studie zur Erstellung von Genexpressionsprofilen gewählt.

RNA wird schnell durch weit verbreitet auftretende RNAsen abgebaut und ist daher eine besonders labile Molekülklasse (Hamasaki, Iida et al. 2001). Für die Arbeit mit RNA sind daher besondere Vorsichtsmaßnahmen und Kontrollschritte notwendig (Schroeder, Mueller et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit erstreckten sich die genannten Vorsichtsmaßnahmen auf die Gewinnung und Lagerung von Gewebeproben und die RNA-Isolierung. Bei der Probengewinnung und -lagerung wurde ein RNA-Stabilisationsmedium nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Obwohl kontrovers diskutiert, bietet dieses Produkt nach Meinung einiger Autoren die Möglichkeit der sicheren und praktikablen Lagerung von Proben, aus welchen in der Folge RNA isoliert werden soll (Mutter, Zahrieh et al. 2004; Chowdary, Lathrop et al. 2006; Micke, Ohshima et al. 2006). Die RNA-Isolierung erfolgte unter RNase-freien Bedingungen mit Einsatz von Puffern, welche chaotrope Salze enthalten. Diese Form der RNA-Isolierung gewährleistet nach Einschätzung vieler Autoren den Schutz der Proben-RNA vor Degradation (Sambrook, Fritsch et al. 1989; Noonberg, Scott et al. 1995; Bonham and Danielpour 1996; Bastard, Chambert et al. 2002).

Die oben erwähnten Kontrollschritte zur Feststellung der RNA-Integrität erfolgten durch kapillarelektrophoretische Analyse der Proben-RNA. Da bei diesem Verfahren hauptsächlich die ribosomale RNA (rRNA) als Indikator für die Integrität der mRNA genutzt wird, bleibt dessen Zuverlässigkeit Gegenstand kontroverser Diskussionen (Schroeder, Mueller et al. 2006). Dennoch sind einige Autoren der Meinung, dass die kapillarelektrophoretisch

gemessene RNA-Integrität einen geeigneten Indikator für die Bewertung von Proben-RNA darstellt (Bastard, Chambert et al. 2002; Fleige and Pfaffl 2006; Micke, Ohshima et al. 2006; Schroeder, Mueller et al. 2006).

Zur Erstellung von Genexpressionsprofilen durch qPCR ist die reverse Transkription der Proben-RNA in cDNA notwendig (cDNA). Für die Erstellung biologisch präziser Daten ist es erforderlich, dass eine proportionale Abbildung (Synthese) der Kopienzahlen der in der Probe enthaltenen RNA-Sequenzen stattfindet (Bustin 2002). Daher wurde ein kommerziell erhältliches System verwendet, für welches die Proportionalität dieser Abbildung experimentell nachgewiesen wurde (Ginzinger 2002).

Zur Normalisierung der Daten aus qPCR-Experimenten wurden die Expressionsraten von Referenzgenen in den entsprechenden Proben in die Auswertung einbezogen. In zahlreichen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass kein Gen als ein universell einsetzbares Referenzgen geeignet ist. Im Einklang mit entsprechenden Vorgaben aus der Literatur wurde eine Kombination aus drei in Voruntersuchungen experimentell ausgewählten Referenzgenen verwendet (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Etschmann, Wilcken et al. 2006). Wird darauf verzichtet, optimale Referenzgene auszuwählen, wirkt sich dies besonders dann aus, wenn nur geringe Schwankungen in der Transkriptionsrate zweier Vergleichsproben bestehen. In der vorliegenden Arbeit ergab die relative Expression der Referenzgene in den drei Tumorgruppen eine optimale Stabilität. Minimale Schwankungen einiger weniger Werte können u.a. als Messfehler gewertet werden.

Die relative Expressionsrate des zu untersuchenden Gens (gene of interest, GOI) wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak and Schmittgen 2001). Auf eine Verwendung einer abgewandelten, um die qPCR-Effizienz korrigierten Version dieser Berechnungsmethode wurde verzichtet, da für alle eingesetzten qPCR-Untersuchungsmethoden bekannt war, dass die Effizienz über 90 % beträgt (Pfaffl 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die relative Quantifizierung der Targetgene in den Tumorproben mit nichtneoplastischem (unverändertem) Mammadrüsengewebe als Kontrollgewebe und mit Haut als potentiellm Kontrollgewebe durchgeführt. Haut und nichtneoplastisches Mammagewebe unterschieden sich teilweise sehr stark in der gemessenen Expressionsrate ihrer Targetgene, so dass sich Haut weder für simple Karzinome noch für komplexe Karzinome als Kontrollgewebe für die qPCR-Auswertung eignete. Diese Ergebnisse können ursächlich darauf zurückzuführen sein, dass Haut und Milchdrüsengewebe histogenetisch heterogene Gewebe sind. Des Weiteren wurden die

Expressionsraten der in diesem Projekt verwendeten Referenzgene nicht für die Haut getestet. Die somit fehlende Normalisierung der qPCR-Daten der Haut könnten möglicherweise einen weiteren Grund für die Expressionsabweichungen darstellen.

Transformierte Zellen zeichnen sich durch ihre genomische Instabilität aus. Sie können möglicherweise gegen Tumorsuppressoren resistent werden, proliferieren in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und zeichnen sich durch Invasivität und Metastasierungsvermögen aus. Ferner entziehen sie sich wie oben bereits erwähnt wurde der Apoptose, steigern die Angiogenese und schädigen das Immunsystem. Diese Funktionen, die in der Karzinogenese mit Hilfe genetischer, epigenetischer oder somatischer Modifikationen gestört werden, unterliegen physiologisch der Führung spezifischer Signaltransduktionswege (Elliott and Blobe 2005).

Der TGF-beta-Signaltransduktionsweg spielt für die Steuerung und Ausführung der genannten Funktionen eine maßgebliche Rolle. Es ist zudem bekannt, dass TGF-beta1 sich durch biphasische Effekte in der Karzinogenese auszeichnet (Derynck, Akhurst et al. 2001). Dies wurde erneut durch die Ergebnisse dieser Studie bestätigt.

In den Untersuchungen zur relativen Expression der TGF-beta-Isoformen konnte in simplen Karzinomen und komplexen Karzinomen für TGF-beta1 die Tendenz einer verminderten Expression festgestellt werden. Hochmaligne simple Karzinome wiesen eine eindeutig vermehrte Expression von TGF-beta1 auf. In Adenomen war keine klare Genregulation zu erkennen. Die Ergebnisse zu TGF-beta1 stimmen mit den Angaben vieler Autoren überein, die TGF-beta1 eine zentrale Bedeutung in der Karzinogenese einräumen (Akhurst and Derynck 2001; Elliott and Blobe 2005; Kim, Kim et al. 2005; Fleisch, Maxwell et al. 2006). TGF-beta1 ist die Isoform mit der höchsten Konzentration im Mammagewebe und wird im Gegensatz zu TGF-beta2 und 3 in den meisten Geweben vorwiegend exprimiert (Elliott and Blobe 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit den bereits existierenden Erkenntnissen, dass TGF-beta1 im Frühstadium der Karzinogenese bzw. in niedrig malignen Tumortypen seine Funktion als Tumorsuppressor beibehält, jedoch vermindert exprimiert wird. Transformierte Zellen, die die Isoform vermindert exprimieren, entgehen den wachstumshemmenden und apoptosefördernden Eigenschaften.

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von TGF-beta1 in hochmalignen simplen Karzinomen der Mamma deutlich, dass diese gegen die Tumorsuppressorfunktion resistent werden können. Sie exprimieren den Faktor vermehrt, um von seinen proangiogenetischen, immunsuppressiven und der TGF-beta-induzierten EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) zu profitieren (Akhurst and Derynck 2001; Fleisch, Maxwell et al. 2006). Die Frage, inwiefern transformierte Zellen eine Resistenz

gegen die tumorsuppressiven Effekte von TGF-beta entwickeln, bleibt Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Das Vorhandensein von Kompensationsmechanismen, die die tumorsuppressiven Wirkungen der TGF-beta-Isoformen aufrechterhalten, wurde für verschiedene Zelltypen unterschiedlich diskutiert. *In vitro*-Untersuchungen von Bascom (1989) zeigten bezüglich TGF-beta1, 2 und 3 in nichttransformierten Fibroblasten (AKR-2B-Fibroblasten) und Epithelzellen (BALB/Mäusekeratinozyten) eindeutige Expressionsunterschiede. In Fibroblasten konnte eine TGF-beta1-Expressionsinduktion die Expression des Gens (Autoinduktion) erhöhen. Die Expression von TGF-beta2 und 3 nahm jedoch ab. Die experimentelle Expressionsinduktion von TGF-beta2 führte zu einer vermehrten Expression der anderen beiden Isoformen (TGF-beta1 und 3) (Bascom, Wolfshohl et al. 1989).

2004 wurden Untersuchungen zu den TGF-beta-Isoformen in LTBP-4-knock out-Lungenfibroblasten durchgeführt. Das Bindungsprotein LTBP-4 bindet als einzige der Isoformen ausschließlich an TGF-beta1. Die Konsequenz aus dem Versuch war eine verminderte Sekretion des TGF-beta1-Moleküls in den Extrazellulärraum (EZR), was in Folge zu einer verminderten Konzentration des aktiven TGF-beta1-Proteins führte. Die Expressionsrate war jedoch unverändert. Die Analyse der anderen beiden TGF-beta-Isoformen zeigte eine vermehrte Expression und Sekretion in den EZR (Koli, Wempe et al. 2004). Die durchgeführten Untersuchungen zu den TGF-beta-Isoformen in Fibroblasten weisen darauf hin, dass (1.) TGF-beta1 ein potenter Repressor von TGF-beta2 und TGF-beta3 ist (Bascom, Wolfshohl et al. 1989) und (2.) ein Absinken seiner extrazellulären Konzentration einen Kompensationsversuch durch die anderen beiden Isoformen zur Folge hat.

In den nichttransformierten Mäusekeratinozyten erfolgte auf die experimentelle Induktion der TGF-beta1-Expression im Unterschied zu den Fibroblasten nicht nur eine verstärkte Autoinduktion von TGF-beta1, sondern auch eine gesteigerte Expression von TGF-beta2 und 3 (Bascom, Wolfshohl et al. 1989).

Die TGF-beta-Isoformen werden *in vivo* topographisch (Lokalisation) und kinetisch (Zeit) unterschiedlich im Embryogeneseprozess (Pelton, Saxena et al. 1991), in der Wundheilung (Levine, Moses et al. 1993; Yue and Mulder 2001) und in der Karzinogenese (Gold, Saxena et al. 1994) exprimiert, so dass einige Autoren den Isoformen individuelle, nicht überlappende Funktionen zuordnen, was gegen einen Kompensationsmechanismus sprechen würde (Gold, Jussila et al. 2000; Cho, Hong et al. 2004).

In *in vitro*-Experimenten mit Keratinozyten-(HaCaT-)passagen, die einen aufsteigenden Malignitätsgrad aufwiesen und in *in vivo*-Untersuchungen von Tumortransplantaten an Nacktmäusen, wurde im Jahr 2000 das Expressionsmuster und die Proteinsynthese der TGF-beta-Isoformen analysiert. Resultat der Untersuchungen war neben einer unterschiedlichen Lokalisation in der Haut auch ein ungleiches Expressionsmuster der Isoformen in unterschiedlichen Malignitätsstadien der oben beschriebenen Zelllinie (HaCaTs), so dass der Autor den Isoformen keinen Kompensationsmechanismus zuordnete, sondern ihnen divergente Funktionen in der Karzinogenese zuschrieb (Gold, Jussila et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Einzelgenanalyse von TGF-beta2 und 3 in simplen Karzinomen und komplexen Karzinomen sowie in Adenomen keine eindeutige Expressionsregulation. In hochmalignen simplen Karzinomen war die Expression beider Isoformen unreguliert. Die Ergebnisse der Einzelgenanalysen lassen entsprechend den Ergebnissen von Gold *et al.* (2000) keinen eindeutigen Kompensationsmechanismus der TGF-beta-Isoformen 1, 2 und 3 erkennen.

Hochmaligne (metastasierende) Mammatumore exprimierten TGF-beta1 vermehrt im Gegensatz zu den anderen beiden Isoformen (TGF-beta 2 und 3), die normal exprimiert wurden bzw. unreguliert blieben. Diese Erkenntnis widerspricht den Ergebnissen von Bascom *et al.* (1989). In den Mäusekeratinozyten erfolgte auf eine erhöhte TGF-beta1-Expression auch eine gesteigerte Expression von TGF-beta2 und 3. Hieraus ergeben sich verschiedene Diskussionspunkte. Es wäre möglich, dass nicht nur zwischen histogenetisch unterschiedlichen Zelltypen Expressionsunterschiede existieren, sondern auch zwischen unterschiedlichen epithelialen Geweben. TGF-beta1 könnte in Mammaepithelien ein Repressor für die anderen beiden Isoformen darstellen. Das würde erklären, warum TGF-beta2 und TGF-beta3 in hochmalignen Mammatumoren der vorliegenden Arbeit unreguliert blieben. Ferner sollte geklärt werden, ob das für TGF-beta1 kodierende Gen eventuell Mutationen unterliegt. Die Auswirkung einer Mutation des TGF-beta1-Gens könnte zu einer verstärkten Transkriptionsinduktion eines anderen Gens führen. Alternativ könnte ein reduzierter Abbau von TGF-beta1 zu Grunde liegen, was wiederum eine gesteigerte Expression von TGF-beta1 in transformierten Zellen hochmaligner Mammakarzinome induzieren könnte. Mutationen an gerade diesem Gen würden für die dominierende Rolle des TGF-beta1 als Wachstumsinhibitor in caninem Mammagewebe sprechen.

Einen weiteren Diskussionspunkt bietet die Tatsache, dass Kompensationsmechanismen der Isoformen bisher für nichtneoplastische Zellen nachgewiesen wurden. Neoplasien sind

jedoch genetisch instabil. Das genetische Profil ist verändert, so dass sich die Frage stellt, ob eine Kompensation in transformierten Zellen überhaupt möglich ist.

Dieser These sollte jedoch gegenübergestellt werden, dass in diesem Projekt *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt wurden. Canines Mammagewebe ist histogenetisch heterogen. Es ist nicht auszuschließen, dass die verarbeiteten Gewebeproben Anteile unterschiedlicher Zelltypen wie z.B. Fibroblasten enthalten, die bezüglich der TGF-beta-Isoformen im Vergleich zu epithelialen Zellen differentielle Expressionsprofile aufweisen können und somit bestehende Korrelationen der Genexpression der Isoformen eventuell maskieren.

Nachhaltig sollte in prospektiven Studien geklärt werden, in welchem Ausmaß Zelltypen anderer Histogenese und Keimblattzugehörigkeit die Expressionsverhältnisse transformierter epithelialer Zellen in caninem Mammagewebe beeinflussen.

Die LTBP-Isoformen sind am Sekretions- und Aktivierungsprozess der TGF-beta-Isoformen wesentlich beteiligt. Sie haben eine essentielle Bedeutung für die TGF-beta-Assoziation in oder mit der EZM, so dass sie im Einvernehmen einiger Autoren als Modulatoren der Bioverfügbarkeit und als Chaperone bezeichnet werden (Oklu and Hesketh 2000; Koli, Saharinen et al. 2001; Rifkin 2005; Todorovic, Jurukovski et al. 2005).

Die Koregulation der Genexpression der TGF-beta- und LTBP-Isoformen ist bereits von einigen Autoren vermutet und teilweise erörtert worden (Miyazono, Olofsson et al. 1991; Taipale, Miyazono et al. 1994; Sterner-Kock, Thorey et al. 2002; Todorovic, Jurukovski et al. 2005).

Die LTBP-1-Expression ist bisher im Zusammenhang mit TGF-beta1 in Ovarialkarzinomen und in Leberkarzinomen analysiert worden. Die Ergebnisse divergieren in Bezug auf die LTBP-1-Expression. (Die TGF-beta1-Expression war in beiden Untersuchungen vermehrt). In Leberkarzinomen wurde eine verminderte LTBP-1-Expression (Roth-Eichhorn, Heitmann et al. 2001) und in Ovarialkarzinomen eine vermehrte LTBP-1-Expression ermittelt (Higashi, Sasagawa et al. 2001; Higashi, Kyo et al. 2006). Die Gründe hierfür werden von den Autoren kontrovers diskutiert. Im Fall der verringerten Expression von LTBP-1 in Leberkarzinomen geht Roth-Eichhorn von einem von den LTBP-Isoformen unabhängigen TGF-beta-Sekretions- und -Aktivierungsmechanismus aus (Roth-Eichhorn, Heitmann et al. 2001). Die Überexpression der LTBP-1-Isoform in Ovarialkarzinomen wird mit ihrem verstärkenden Effekt auf die TGF-beta1-Sekretion ins Stroma und die umliegenden Karzinomzellen begründet (Higashi, Sasagawa et al. 2001). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche gewebsspezifische Funktion des LTBP-1-Gens hin.

Die Analyse der LTBP-1-Expression zeigte in simplen und komplexen Mammakarzinomen eine Tendenz zur verminderten Expression und in Adenomen keine eindeutige Regulation;

während die Expression in hochmalignen simplen Karzinomen sich eindeutig vermehrt präsentierte. Anhand der Ergebnisse lässt sich eine Koregulation der Expression von TGF-beta1 und LTBP-1 vermuten. Eine vermehrte Expression von LTBP-1 in den untersuchten hochmalignen simplen Mammatumoren könnte in diesem Fall wie in den genannten Genexpressionsanalysen von LTBP-1 in Ovarialkarzinomen mit einer verbesserten und potenteren Bioverfügbarkeit von TGF-beta1 begründet werden.

Die Bedeutung von LTBP-3 für die TGF-beta-Isoformen wurde bislang anhand von LTBP-3-hypomorphen Mäusen deutlich (siehe auch 2.4.6). Diese wiesen einen konstant niedrigen Level an TGF-beta auf Expressions- und Proteinebene auf (Dabovic, Chen et al. 2002; Dabovic, Chen et al. 2002).

Die relative Quantifizierung von LTBP-3 zeigte in Proben von simplen und komplexen Mammakarzinomen und Adenomen eine vermehrte Expression. Dieses Ergebnis könnte im Sinne des Erhalts der Tumorsuppressorfunktion der TGF-beta-Isoformen für einen Kompensationsmechanismus sprechen. Sowohl LTBP-1 als auch LTBP-4 waren in diesen Tumortypen tendenziell (LTBP-1) bzw. deutlich (LTBP-4) in ihrer Expression vermindert. LTBP-3 wird im Unterschied zu den anderen Isoformen nicht an die Matrix im EZR gebunden (Penttinen, Saharinen et al. 2002). Der Grund dafür ist noch nicht bekannt. Es wäre jedoch denkbar, dass LTBP-3 nicht an die Matrix bindet, um Zielzellen eine schnellere Verfügbarkeit von TGF-beta zu ermöglichen. Da TGF-beta als Wachstumsinhibitor in der Karzinogenese vermutlich eine kurze Halbwertszeit hat, wäre es notwendig, dass sezerniertes TGF-beta in der Signaltransduktionskaskade schnell als Ligand zur Verfügung steht und somit die SMAD-Kaskade aktiviert. Die Begründung hierfür läge in der Förderung wachstumsinhibierender Effekte, um der ungebremsten Proliferation transformierter Gewebe entgegenzusteuern. Die Analyse der relativen Quantifizierung in simplen und komplexen Mammakarzinomen weist darauf hin, dass das TGF-beta-Bindungsprotein LTBP-3 eine zentrale Rolle als Chaperon- und Transportmolekül für TGF-beta1 einnimmt.

In hochmalignen simplen Mammatumoren ergab die relative Quantifizierung von LTBP-3 im gleichen Maße wie für LTBP-1 eine klare Tendenz zur vermehrten Genexpression. Die Ergebnisse zu LTBP-1 und -3 geben zusätzlich einen Hinweis darauf, dass diese Isoformen eine hohe Bindungsaffinität zu TGF-beta1 besitzen und somit zentrale Modulatoren seiner Bioverfügbarkeit darstellen. Die Bedeutung der beiden Bindungsprotein-Isoformen für TGF-beta1 wurde durch die proportionale Korrelation der Genexpression deutlich.

Die gewebespezifische Bedeutung von LTBP-4 für die TGF-beta-Signaltransduktion in der Karzinogenese wird bereits in der Literatur erläutert. Mit Hilfe einer Genfallenstrategie

wurden LTBP-4-hypomorphe Mäuse gezüchtet, die neben anderen Krankheitsbildern Kolorektalkarzinome entwickelten. Die TGF-beta-Expression war in den epithelialen transformierten Zellen dieser Mäuse nicht gestört. Auf Proteinebene konnte eine verminderte Aktivierung des TGF-beta1-Proteins mittels Immunofluoreszenz detektiert werden (Sternier-Kock, Thorey et al. 2002).

LTBP-4 wurde in der vorliegenden Arbeit in allen Tumortypen unabhängig von der Tumorklassifizierung und dem Metastasierungsgrad vermindert exprimiert. Dies zeigt, dass sich LTBP-4 unabhängig von Dignität als bedeutender und genetisch konservierter Indikator für neoplastische Geschehen epithelialer Gewebe erweist. Es bestätigt zudem die Vermutung von Sternier-Kock *et al.* (2002). Die Autoren bezeichnen das Gen als Kandidatengen für die Genese von epithelialen Neoplasien (Sternier-Kock, Thorey et al. 2002). Im Gegensatz zu den Angaben von Sternier-Kock *et al.* wurden in den verschiedenen Tumortypen (simple Karzinome, komplexe Karzinome und hochmaligne simple Karzinome) unterschiedliche TGF-beta1-Expressionsmuster ermittelt, sodass keine eindeutige Regulationstendenz festzustellen war. Dieses Ergebnis deutet auf eine gewebsspezifische Funktion von LTBP-4 in caninem Mammagewebe hin, die von dem TGF-beta-Signaltransduktionsweg abweicht. Ferner könnte seine Rolle als Matrixprotein bedeutsam sein. Das Fehlen von LTBP-4 führt zu einer gestörten Matrixzusammensetzung im EZR. Wie bereits in der Literatur thematisiert wird, wäre es möglich, dass der Erhalt der Integrität der Extrazellulärmatrix eine wesentliche Bedeutung in der Prävention von Krebszellinvasion, -proliferation und Metastasierung hat (Sternier-Kock, Thorey et al. 2002).

Die Auswertung der Genexpression der LTBP-Isoformen 1, 3 und 4 sollte unter Berücksichtigung des Expressionsmusters der TGF-beta-Isoformen in verschiedenen Malignitätsgraden vorgenommen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie beleuchten erstmalig die Expression der LTBP-Isoformen 1, 3 und 4 unter Berücksichtigung unterschiedlicher Stadien der Tumorprogression in (caninem) Mammagewebe. Wie zuvor erwähnt, hat TGF-beta1 im Frühstadium maligner Neoplasien bzw. in niedrig malignen Tumoren tumorsuppressive Effekte. Hochmaligne Neoplasien scheinen eine Resistenz gegen die wachstumshemmenden und apoptotischen Effekte von TGF-beta auszubilden, um die prokanzerogenen Eigenschaften des Targetgens zu Gunsten des Tumorwachstums und der Metastasierung auszunutzen. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Expressionsanalysen von TGF-beta1 in den verschiedenen Tumorgruppen, so dass die Genanalysen der LTBP-Isoformen unter folgenden unterschiedlichen Aspekten betrachtet werden sollten:

1. der Unterstützung des Erhaltes der Tumorsuppressorwirkung von TGF-beta in simplen und komplexen Karzinomen sowie Adenomen und

2. der Förderung der prokanzerogenen Wirkungen von TGF-beta1 in hochmalignen simplen Karzinomen.

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der LTBP-Isoformen in simplen und komplexen Karzinomen lassen eine Kompensation der mangelnden LTBP-1- und LTBP-4-Expression durch eine vermehrte LTBP-3-Expression vermuten, damit die tumorsuppressiven Eigenschaften der TGF-beta-Isoformen aufrechterhalten bleiben.

Das Expressionsmuster der LTBP-Isoformen in hochmalignen simplen Karzinomen der caninen Mamma ist möglicherweise unter einem anderen Gesichtspunkt zu betrachten. Die LTBPs sind Modulatoren der Bioverfügbarkeit von TGF-beta (Todorovic, Jurukovski et al. 2005).

Wird TGF-beta1 vermehrt exprimiert, steigt zusätzlich der Bedarf an Bindungsproteinen (LTBPs) in ihrer Funktion als TGF-beta-Chaperone an, so dass in der Folge LTBP-1 und LTBP-3 ebenfalls in hochmalignen Mammatumoren vermehrt exprimiert werden. Dieser Effekt dient der Unterstützung bzw. Förderung prokanzerogener Eigenschaften von TGF-beta1.

Die bisher erläuterten Ergebnisse der deskriptiven (beschreibende) Analyse der einzelnen Targetgene weisen auf Korrelationen der Expression zwischen TGF-beta1 und den LTBP-Isoformen 1 und 3 und auf bestehende Kompensationsmechanismen zwischen den LTBP-Isoformen 1, 3 und 4 hin.

Um die Resultate des Expressionsmusters der Einzelgenanalysen zu verifizieren und weitere bestehende Abhängigkeiten innerhalb der untersuchten Targetgene aufzuzeigen, wurden statistische Tests durchgeführt.

Der U-Test nach Mann-Whitney zeigte im Durchschnitt ein ähnliches Expressionsmuster der Targetgene in simplen und komplexen Karzinomen. Beide Tumortypen sind epithelialen Ursprungs. Sie unterscheiden sich aber in der Beteiligung der Zelltypen (siehe Klassifikation unter 2.2.3.1). Die Testergebnisse könnten auf die gleiche Keimblattzugehörigkeit der betroffenen Zelltypen zurückführen sein. Einen weiteren Erklärungsansatz für die nichtsignifikanten Ergebnisse aus dem U-Test bietet die in der Karzinogenese erfolgende zelluläre Transformation. Zellen können bis zum vollständigen Verlust der Gewebezugehörigkeit entdifferenzieren. Infolgedessen wäre es denkbar, dass sich die transformierten Zellen in unterschiedlichen epithelialen Tumoren der caninen Mamma aufgrund dieses Zustandes derselben Genregulationsmechanismen bedienen.

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung wurden bereits einzeln für jedes der sechs Targetgene diskutiert. Vereinzelt konnten Hypothesen über potentiell bestehende Korrelationen der Genexpression oder Kompensationsmechanismen zwischen und innerhalb

der Isoformen aufgestellt werden. Aufgrund der Menge an untersuchten Genen ließen sich nicht alle Relationen (Korrelations- und Kompensationsmechanismen der Targetgene) ohne statistische Hilfsmittel erkennen. Daher wurden Kreuztabellen von den Expressionsmustern der Targetgene in simplen und komplexen Karzinomen erstellt und der Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt.

Der Chi-Quadrat-Test zeigte signifikante Ergebnisse zwischen folgenden Genen: »TGF- β 1 und TGF-beta2«, »TGF- β 1 und LTBP-3«, »TGF- β 1 und LTBP-4«, »TGF- β 2 und LTBP-3«, »TGF- β 2 und LTBP-3«, »TGF- β 2 und LTBP-4«, »TGF- β 3 und LTBP-4«, »LTBP-1 und LTBP-4«, »LTBP-3 als auch LTBP-4«.

Der Signifikanztest weist daraufhin, dass ein Zusammenhang (Korrelation der Genexpression oder eines Kompensationsmechanismus) zwischen den betrachteten Variablen besteht. Mit Hilfe des statistischen Tests wurden mehr Abhängigkeiten nachgewiesen als mit den Einzelgenanalysen. Es zeigte sich, dass entgegen den Vermutungen eine transkriptionelle Abhängigkeit zwischen TGF-beta1 und 2 besteht. Anhand der Kreuztabellen wurde ersichtlich, dass in einem den Erwartungen widersprechenden Prozentsatz der neoplastischen Proben eine vermehrte Expression von TGF-beta1 und 2 erfolgte. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass 1. eine induktive Erhöhung von TGF-beta1 in einem geringen Anteil an Proben erfolgen konnte und 2. TGF-beta1 vermutlich die TGF-beta2-Expression in diesen Proben induziert hat.

Ferner wurde, entgegen den Erwartungen, für das LTBP-4-Gen eine bestehende Expressionsabhängigkeit zu den anderen LTBP-Isoformen und den TGF-beta-Isoformen ermittelt. Auch zeigte sich anhand der Kreuztabellen, dass im Fall einer vermehrten TGF-beta1-Expression zusätzlich eine vermehrte LTBP-4-Expression erfolgte.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Tumorsuppressorfunktion der TGF-beta-Isoformen 1 und 2 auf Expressionsebene in einem geringen Prozentsatz an Neoplasien der caninen Mamma nicht gestört war. In diesen Fällen kann nur begrenzt etwas über die Tumorsuppressorfunktion ausgesagt werden, da nur eine Aussage auf Expressionsebene von TGF-beta1 und 2 getroffen werden konnte. Inwiefern »Downstream-Elemente« in der TGF-beta1-Signaltransduktion betroffen sind, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Daraus erschließt sich dennoch für prospektive Studien, dass innerhalb der klassifizierten Tumorgruppen eine Malignitätsgraduierung erfolgen sollte. Anhand dieser könnte es vielleicht gelingen, die Disposition der TGF-beta-Funktion vom Tumorsuppressor über den Verlust seiner tumorsuppressiven Wirkung bis hin zu seinen Promotor-Effekten auf Ebene der Genexpression zu ermitteln.

Die Darstellung der Korrelation der Genexpression der Targetgene in hochmalignen simplen Karzinomen und in Adenomen erfolgte aufgrund niedrigerer Fallzahlen deskriptiv mittels mehrfacher Liniendiagramme.

Für die hochmalignen Neoplasien zeigte sich erneut deutlich, dass bei einer vermehrten Expression von TGF-beta1 sowohl LTBP-1 und -3 vermehrt exprimiert als auch LTBP-4 vermindert exprimiert wurden. Dies unterstreicht besonders die Existenz von Expressionskorrelationen zwischen »TGF-beta1 und LTBP-1« als auch »TGF-beta1 und LTBP-3«.

Die untersuchten Adenome wiesen jeweils ein stark divergierendes Expressionsmuster der sechs untersuchten Targetgene auf, so dass keine eindeutigen Tendenzen zu Expressionsabhängigkeiten festgestellt werden konnten. Es war jedoch auffällig, dass benigne Neoplasien eine starke Abweichung des Genexpressionsprofils vom physiologischen Zustand aufwiesen und damit möglicherweise prognostisch eine Aussage zulassen. In zukünftigen Projekten könnte in einer repräsentativen Anzahl an Adenomen ein weiterer Ansatzpunkt für die Analyse der Genexpression der TGF-beta- und LTBP-Isoformen liegen.

Die primäre Multiplizität spielt beim Hund eine wichtige Rolle (Gutberlet, Wey et al. 1998). Frye *et al.* (1967) stellten Kriterien für die primäre Multiplizität auf. Zu den bestimmten Merkmalen gehören unter anderem, dass sich die Tumore histopathologisch unterscheiden sollen und ferner keine Metastasen anderer Neoplasien darstellen (Frye, Dorn et al. 1967). In der vorliegenden Arbeit konnten in einigen Fällen mehrere Neoplasien aus einer Mammaleiste entnommen und pathohistologisch klassifiziert werden. Einige Tiere wiesen in unterschiedlichen Mammakomplexen Tumore mit gleicher Klassifizierung auf, wohingegen bei anderen Individuen verschieden klassifizierte Tumore innerhalb eines bzw. in unterschiedlichen Mammakomplexen auftraten. Der Vergleich primär multipler Tumore auf Ebene der Genexpression zeigte teilweise ein relativ homogenes und teilweise ein anscheinend abweichendes Expressionsmuster der Targetgene. Homogener Natur war das Genexpressionsmuster, wenn in einer Mammaleiste mehrere simple Karzinome untersucht wurden. Heterogen erschienen dagegen eher die komplexen Karzinome. Die Expressionsergebnisse lassen sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass das Zellbild in simplen Karzinomen einheitlicher ist. Jedoch sollte darauf hingewiesen werden, dass der U-Test im Vergleich für beide Tumortypen ein sehr ähnliches Expressionsprofil der Targetgene ermittelt hat. Wird bei der Betrachtung unterschiedlicher Zellen von einem identischen Karzinogenesemechanismus ausgegangen, eignet sich vermutlich keines der Targetgene als potentieller Marker für die Identifizierung einer bestehenden primären Multiplizität. Anhand der Ergebnisse konnten ferner keine Aussagen über das Vorliegen einer primären Multiplizität getroffen werden.

Zusammenfassend sprechen die auf der molekularbiologischen Ebene gewonnenen Dissertationsergebnisse für einen komplex ablaufenden Mechanismus der Karzinogenese, in dem sowohl die TGF-beta-, als auch die LTBP-Isoformen eine wesentliche Rolle spielen. Die LTBP-Isoformen 1 und 3 zeigten insbesondere eine transkriptionelle Koregulation mit TGF-beta1. Diese war unabhängig von der Dignität des Tumortyps vorhanden. Die TGF-beta2-Expression wurde durch eine vermehrte TGF-beta1-Expression induziert. Die Analyse der LTBP-4-Expression in der Karzinogenese der caninen Mamma stützt die Vermutung, dass LTBP-4 nicht nur eine wesentliche Bedeutung als Matrixprotein hat, sondern auch als Bindungsprotein von TGF-beta1. Die Ergebnisse bestätigen damit die Annahmen über dessen duale Rolle in der Pathogenese von Mammatumoren.

Bei der Auswertung der Genexpression der Targetgene nach unterschiedlichen Dignitätsgruppen ergaben sich dennoch bezogen auf die Arbeitshypothesen teilweise sehr differentielle Resultate. Somit kann angenommen werden, dass sich die Expressionsprofile je nach Dignität (Adenome, simple und komplexe Karzinome und hochmaligne, simple Karzinome) unterscheiden, und im Pathogeneseprozess caniner Mammatumore abweichende Bedeutungen haben.

In prospektiven Projekten wäre es sinnvoll, *in vitro*-Untersuchungen durchzuführen und epitheliale bzw. myoepitheliale Zelllinien aus caninem Mammagewebe mit unterschiedlichen Malignitätsgraden zu etablieren. Ferner bestünde die Möglichkeit, über Wildtyp-Zellen hinaus genetisch manipulierte Zellen zu züchten, in denen eine Defizienz respektive eine Überexpression der am meisten betroffenen Targetgene wie zum Bsp. TGF-beta 1 experimentell induziert wird. Solche Untersuchungsmodelle könnten auf transkriptioneller Ebene wichtige Hinweise zu den anderen potentiell betroffenen Genen liefern.

Eine andere Methode der Einzelzellgewinnung ist das molekularbiologische Verfahren der »Laser microdissection« aus morphologisch ausdiagnostizierten caninen Mammatumoren. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, *in vivo*-Untersuchungen an pathomorphologisch definierten Gewebeproben durchführen zu können. Es wäre möglich, die Genexpressionsprofile von transformierten Epithelzellen zu ermitteln und mesenchymale Zellen aus den Untersuchungen auszuschließen.