

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
2	LITERATURÜBERSICHT	11
2.1	Mammatumoren der Hündin	11
2.1.2	Epidemiologie von Mammatumoren	11
2.1.3	Ätiologie und Pathogenese	12
2.1.4	Nomenklatur und Klassifikation	13
2.1.4.1	Epitheliale Tumoren	15
2.1.4.2	Mesenchymale Tumoren und Karzinosarkome	16
2.2	Tumorbiologie von Karzinomen der Mamma	16
2.3	Der Zellzyklus	19
2.3.1	Zusammenfassung	19
2.4	Kontrolle und Regulation des Zellzyklus	21
2.4.1	Allgemeines	21
2.4.2	Cyclin-abhängige Cyklinkinasen als Schlüsselenzyme der Zellzyklusregulation	22
2.4.2.1	Die G1-Phase des Zellzyklus	27
2.4.3	Inhibitorische Untereinheiten Cyclin-abhängiger Kinasen	29
2.4.3.1	Die CIP/KIP-Familie	30
2.5	Funktionen und Regulation des Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitors p21 <sup>CIP1/WAF1</sup>	33
2.6	Funktionen und Regulation des Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitors p27 <sup>KIP1</sup>	39
3	MATERIAL UND METHODEN	46
3.2	Histologische Untersuchung	46
3.2.1	Probenaufbereitung	46
3.2.2	Histologische Beurteilung	
3.2.2.1	Ausschnitt aus den WHO-Richtlinien zur Klassifizierung von Mammatumoren	47
3.3	Immunhistochemie	48
3.3.1	Prinzip	48
3.3.2	Prinzip des Streptavidin-Biotin-Systems	49
3.3.3	Durchführung der Immunhistochemie	49
3.4	Isolierung der Gesamt-RNA aus tierischen Zellen	51
3.4.1	Stabilisierung der Proben-RNA	51
3.4.2	Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben	51
3.4.3	Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes	53
3.4.4	RNA-Qualitätskontrolle	53
3.5	Konventionelle PCR	54
3.5.1	RT und PCR allgemein	54
3.5.2	Reverse Transkription (qualitativ)	55
3.5.3	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonukleotide für die konventionelle PCR	55
3.6	Durchführung der konventionellen PCR	56
3.6.1	DNA-Gelelektrophorese	56
3.6.2	Präparative Gelelektrophorese und Extraktion einer DNA-Bande	57
3.7	Klonierung von Plasmiden	58
3.7.1	Klonierung von DNA in Plasmiden allgemein	58
3.7.2	Ligationsprotokoll	58
3.7.3	Präparation kompetenter E. coli	59

3.7.4	Transformation	60
3.7.5	Selektion plasmidtragender Bakterien	60
3.7.6	Präparation von Plasmid-DNA	61
3.7.7	Restriktionsenzymverdau	62
3.8	Sequenzierung	62
3.9	Quantitative PCR	63
3.9.1	Allgemeines	63
3.9.2	cDNA-Synthese	64
3.9.3	Protokoll der qPCR	65
3.9.4	Etablierungsverfahren	65
3.9.4.1	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die qPCR	65
3.9.4.2	Bestimmung des Temperaturoptimums	66
3.9.4.3	Bestimmung der PCR-Effizienz	66
3.9.5	Referenzgene	67
3.9.6	Kontrollen	68
3.9.7	Auswertung der q-PCR-Ergebnisse	68
3.9.7.1	Analyse der Amplifikationskurve	68
3.9.8	Relative Quantifizierung (ddC <sub>T</sub> -Methode)	69
3.9.9	Statistische Auswertung	70
3.10	Microarray-Analyse	71
3.10.1	Allgemeines	71
3.10.2	Methode	71
3.10.3	Durchführung	72
4	ERGEBNISSE	74
4.1	Histologische Untersuchung	77
4.1.1	Nicht infiltrierendes (in situ) Karzinom	77
4.1.2	Komplexes Karzinom	77
4.1.3	Einfaches Karzinom	77
4.1.3.1	Tubulopapilläres Karzinom	78
4.1.3.2	Solides Karzinom	78
4.2	Ergebnisse der histologischen Untersuchung	78
4.3	Qualitativer Nachweis der Transkripte von p21 und p27	79
4.4	Sequenzierungsergebnisse	80
4.5	RNA-Qualität	82
4.5.1	Photometrische Messung	82
4.5.2	RNA-Integrität	82
4.6	Ergebnisse der relativen Quantifizierung	82
4.6.1	Etablierung der Assays mittels Regressionsanalyse	82
4.6.2	Beurteilung und Berechnung der Ergebnisse	83
4.6.3	Relative Expressionsdaten von p21 und p27 in den untersuchten Mammakarzinomen	83
4.6.3.1	Relative Expressionsdaten für p21	84
4.6.3.2	Relative Expressionsdaten für p27	87
4.7	Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen	91
5	DISKUSSION	92
5.1	Aufgabenstellung und Arbeitsplan	92
5.2	Versuchskritik	92
5.2.1	RNA-Stabilität	92
5.2.2	RNA-Qualitätskontrolle	93
5.2.3	Referenzgen (β-Aktin)	94

5.3	Untersuchungen zu p21 und p27	94
5.3.1	Zusammenfassung der Untersuchungen zu p21	94
5.3.2	Zusammenfassung der Untersuchungen zu p27	94
5.3.3	Interpretation der Untersuchungen zu p21 und p27	95
5.3.3.1	Untersuchungen von Gewebehomogenaten	95
5.3.3.2	Phylogenetische Unterschiede in caninen und humanen Adenokarzinomen der Mamma	95
5.3.3.3	Posttranskriptionelle Regulation von p21	96
5.3.4	Interpretation der Untersuchungen zu p27	97
5.3.4.1	Posttranskriptionelle Regulation von p27	98
5.4	Abschließende Bewertung und Ausblicke	99
6	ZUSAMMENFASSUNG	100
7	SUMMARY	102
8	ANHANG	104
8.1	Material	104
8.1.1	Tabellarische Darstellung des Probenmaterials	104
8.2	Histologische Untersuchung	106
8.2.1	Probenaufbereitung	106
8.2.1.1	Entparaffinieren der Gewebeschnitte	106
8.2.1.2	Rehydratation in der aufsteigenden Alkoholreihe	106
8.2.1.3	Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	106
8.2.1.4	Verwendete Chemikalien	107
8.2.2	Histologische Beurteilung	107
8.2.2.1	Verwendete Internetseiten	107
8.3	Immunhistochemie	107
8.3.1	Verwendete Antikörper	107
8.3.2	Verwendete Chemikalien	107
8.3.3	Herstellung der verwendeten Puffer	108
8.3.3.1	Ansatz des Citratpuffers	108
8.3.3.2	Ansatz des PBS-Puffers	108
8.3.3.3	Ansatz des TBS-Puffers	108
8.3.4	Herstellung der Färbesubstrate	109
8.3.4.1	Ansatz des DAB (3,3-diamino-Benzidin)-Substrats	109
8.3.4.2	Ansatz des Neufuchsin-Substrats	109
8.4	Isolierung der Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe	109
8.4.1	Stabilisierung der Proben-RNA	109
8.4.1.1	Verwendete Chemikalien	109
8.4.2	Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben	109
8.4.2.1	Verwendete Chemikalien	109
8.4.2.2	Verwendete Utensilien	110
8.4.3	Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes	110
8.4.3.1	Verwendete Chemikalien	110
8.4.4.2	Verwendete Utensilien	110
8.4.5	Reverse Transkription	111
8.4.5.1	Reaktionsansatz und Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription	111
8.4.5.2	Verwendete Chemikalien	111
8.5	Konventionelle PCR	112
8.5.1	Reaktionsansatz und Reaktionsprotokoll der konventionellen PCR	112
8.5.1.1	Verwendete Chemikalien	112

8.5.1.2	Verwendete Utensilien	112
8.5.2	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide	113
8.5.2.1	Verwendete Internetseiten	113
8.5.2.2	Primerhersteller	113
8.5.3	DNA-Gelelektrophorese	113
8.5.3.1	Verwendete Chemikalien	113
8.5.3.2	Verwendete Utensilien	113
8.5.4	Präparative Gelelektrophorese und Extraktion einer DNA-Bande	113
8.5.4.1	Verwendete Chemikalien	113
8.5.4.2	Verwendete Utensilien	113
8.6	Klonierung von Plamiden	114
8.6.1	Ligation	114
8.6.1.1	Verwendete Chemikalien	114
8.6.1.2	Klonierungsvektor	114
8.6.2	Präparation kompetenter E. Coli	114
8.6.2.1	Verwendete Bakterienstämme	114
8.6.2.2	Verwendete Chemikalien	114
8.6.2.2.1	Herstellung des LB-Mediums	114
8.6.2.3	Verwendete Utensilien	114
8.6.3	Transformation	115
8.6.3.1	Chemikalien zur Herstellung verwendeter Puffer und Agarplatten	115
8.6.3.1.1	Herstellung von LB-Agar	115
8.6.3.1.2	Herstellung des NZY-Mediums	115
8.6.3.2	Verwendete Utensilien	115
8.6.4	Präparation von Plasmid-DNA	116
8.6.4.1	Verwendete Chemikalien	116
8.6.4.2	Verwendete Utensilien	116
8.6.5	Restriktionsenzymverdau	116
8.6.5.1	Ansatz für den Restriktionsenzymverdau	116
8.6.5.2	Verwendete Chemikalien	116
8.6.5.3	Verwendete Utensilien	116
8.7	Sequenzierung	117
8.8	Quantitative PCR	117
8.8.1	Reverse Transkription	117
8.8.1.1	Verwendete Chemikalien	117
8.8.1.1.1	Reaktionsansatz und Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription	117
8.8.1.2	Verwendete Utensilien	117
8.8.2	Protokoll der quantitaiven PCR	118
8.8.2.1	Verwendete Chemikalien	118
8.8.2.2	Reaktionsansatz und Reaktionsprotokoll der qPCR	118
8.8.2.3	Verwendete Utensilien	118
8.8.3	Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die qPCR	119
8.8.3.1	Verwendete Internetseiten	119
8.8.3.2	Primerhersteller	119
8.9	Weitere verwendete Utensilien und Geräte	119
8.10	Sequenzen verwendeter Primer	119

8.11	Darstellung der untersuchten Mammatumoren und des korrespondierenden unveränderten Mammagewebes des gleichen Individuums (HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung)	120
8.12	Fotografische Darstellung der immunhisochemischen Untersuchung von p21 in Mammakarzinomen im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe des gleichen Individuums (10-fache Vergrößerung)	129
8.13	C <sub>T</sub> -Werte für p21 und p27	132
8.14	FC-Werte für p21 und p27	134
	LITERATURVERZEICHNIS	