

2 Literaturübersicht

2.1 Mammatumoren der Hündin

2.1.1 Anatomie und Histologie der Milchdrüse

Die Milchdrüse (Mamma) des Hundes entspricht einer zusammengesetzten, modifizierten, apokrinen Schweißdrüse, welche sich aus ektodermalen (epithelialen) Zellen entwickelt. Die Mamma besteht aus zwei normalerweise bilateral symmetrischen Gesäugeleisten, die sich aus je 5 (seltener 4 oder 6) Mammakomplexen zusammensetzen. Die Komplexe werden ihrer Lage nach als kranialer thorakaler (T1), kaudaler thorakaler (T2), kranialer abdominaler (A1), kaudaler abdominaler (A2) und inguinaler (I) Komplex bezeichnet (Evans and Christensen 1993; Habermehl 1996). Das Drüsenparenchym besteht aus Drüsenepithel und Stroma (Calhoun and Stinson 1998). Als Drüse ektodermaler Herkunft wird das Drüsenepithel von kontraktilen Zellen, dem Myoepithel und von einer Basalmembran umgeben (Liebich 2003).

2.1.2 Epidemiologie von Mammatumoren

Mammatumoren stellen mit einem Anteil von bis zu 52 % der Tumorerkrankungen die häufigste Neoplasie der Hündin dar (Nolte and Nolte 2000; Rutteman, Withrow et al. 2001; von Bomhard 2001). Der Anteil der Tiere, die an malignen Neoplasien erkranken, liegt bei 20 bis 40 % aller Tumorträger. Die Entstehung von Mammatumoren wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst (siehe auch 2.2.4). Neben dem Alter der Hündinnen spielen der Zeitpunkt der Kastration bzw. die Kastration *per se* sowie das Vorkommen und die Art der Läufigkeitsunterdrückung eine Rolle. Die Anzahl der Trächtigkeiten, Laktationen oder Scheinträchtigkeiten scheinen keinen Einfluss auf das Mammatumorrisiko zu nehmen (Kessler 2005).

Das Mammatumorrisiko steigt mit zunehmendem Alter, wobei Hündinnen selten vor dem vierten Lebensjahr an Mammatumoren erkranken. Gehäuft tritt diese Erkrankung im Alter zwischen sieben und dreizehn Jahren auf (Gottwald 1998; Moe 2001).

Rassedispositionen werden in der Literatur kontrovers diskutiert und sind aufgrund der regionalen Bevorzugung bestimmter Rassen nur schwer zu ermitteln (Gormann 2001; Rutteman, Withrow et al. 2001).

Bezüglich der Lokalisation von Mammatumoren wird beschrieben, dass die kaudalen Drüsenkomplexe der Mamma eine deutlich höhere Inzidenz der Neoplasien zeigen, als die kranialen Komplexe. Über 80% der Mammatumoren sind in den inguinalen und abdominalen Drüsenkomplexen zu finden. (Gutberlet, Wey et al. 1998)

Bei bis zu 80% der Hündinnen werden multiple Tumoren gefunden (primäre Multiplizität), die unterschiedliche histologische Befunde liefern. Sie differieren in ihrer Dignität und können in einer oder in beiden Mammaleisten nebeneinander lokalisiert sein (Gutberlet, Wey et al. 1998; MacEwen and Withrow 2001).



Abbildung 1 Fotografie eines Mammatumors bei der Hündin (Noahs Arkive, University of Georgia)

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

In der Literatur werden die Ursachen für eine neoplastische Entartung der caninen Mamma kontrovers diskutiert. Laut FERGUSON (Ferguson 1985) ist bei dieser Erkrankung von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen. Mögliche Ursachen sind hormonelle und alimentäre Faktoren. Des Weiteren werden Umwelteinflüsse und immunologische Faktoren beschrieben.

Unter anderem werden auch hormonelle Einflüsse und genetische Prädispositionen bei Rassehunden und deren Bedeutung bei der Entstehung von Mammatumoren

diskutiert. Der Zeitpunkt der Kastration, aber auch die Gabe von Gestagenen zur Läufigkeitsunterdrückung spielen eine signifikante Rolle bei der Entstehung von Mammatumoren. Bei Verabreichung von Geschlechtshormonen (die in praxi zur Läufigkeitsunterdrückung angewandt werden) zeigte sich in unterschiedlichen Studien sowohl bei hoher als auch bei niedriger Dosierung ein vermehrtes Auftreten von Mammatumoren. Das Risiko maligner Tumoren steigt besonders bei der Applikation von Östrogen-Gestagen-Kombinationen (Casey, Giles et al. 1979; Misdorp 1991; Rutteman 1992). Nach Untersuchungen von Misdorp erhöht die hormonelle Läufigkeitsunterdrückung bei der Hündin die Gefahr der Entstehung von benignen Tumoren der Mamma um etwa 40 %. Jedoch zeigt die Läufigkeitsunterdrückung keinen Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens maligner Tumoren, verglichen mit dem Risiko unbehandelter Hündinnen (Misdorp 1988). Der Verabreichung von Gestagenen zur Läufigkeitsunterdrückung ist, hinsichtlich des Risikos der Entstehung von Mammatumoren, eindeutig die Kastration im frühen Alter vorzuziehen (Rutteman 1990). Bei der Kastration einer Hündin vor der ersten Läufigkeit sinkt das Mammatumorrisiko auf 0,05 %, bei Kastration nach der ersten Läufigkeit auf 8 %. Wird die Hündin nach der zweiten Läufigkeit kastriert, so liegt das Risiko der Entwicklung maligner Mammatumoren bereits bei 26 % (Rutteman, Withrow et al. 2001). Nach der zweiten Läufigkeit der Hündin scheint der hemmende Einfluss der Kastration auf das Mammatumorrisiko zu verschwinden (Misdorp 1988). Die Kastration nach der Diagnose eines Mammatumors hat keinen Einfluss auf die Überlebenszeit post operationem, verhindert aber in seltenen Fällen die Entstehung bzw. Ausbildung weiterer Tumoren in anderen Komplexen (Gutberlet, Wey et al. 1998).

Neben den genannten Faktoren wird eine Vielzahl epigenetischer Phänomene diskutiert, die die Entstehung caniner Mammakarzinome beeinflussen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Beschreibung einheitlicher, eventuell „konsistenter“ zellulärer Regelmechanismen im Rahmen der Entstehung caniner Mammakarzinome zu leisten.

2.1.4 Nomenklatur und Klassifikation

Seit den 70er-Jahren erfolgt die Klassifikation humaner Mammatumoren im deutschsprachigen Raum gemäß der Empfehlung der WHO (World Health Organisation). Die jüngste Modifikation der histologischen WHO-Klassifizierung für

Mammatumoren des Hundes und der Katze wurde von MISDORP (Misdorp 1999) verfasst. Sie berücksichtigt klinische Verlaufsstudien, die, vor allem im Fall von malignen Tumoren, dem Verhältnis von Histologie und Prognose eine stärkere Gewichtung geben. So werden die beim Hund häufigsten malignen Mammatumoren nach steigendem Malignitätsgrad wie folgt benannt:

1. nicht infiltrierendes Karzinom (Basalmembran intakt) , 2. komplexes Karzinom (2 Zelltypen des gleichen Keimblattes), 3. einfaches Karzinom (1 Zelltyp); 3.1. tubulopapillärer Typ; 3.2. solider Typ; 3.3. anaplastischer Typ, 4. Spezielle Karzinomformen (Misdorp 1999).

Diese malignen Tumoren bilden die erste der insgesamt drei unterschiedenen Tumorkategorien (siehe Tabelle 1). Der zweiten Kategorie werden die benignen und der dritten die nichtklassifizierten Tumoren zugeordnet. Eine vierte Kategorie bilden Dysplasien und Hyperplasien der Mamma.



Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat



CANINE

1 Malignant Tumors

- 1.1 Noninfiltrating (in situ) carcinoma
- 1.2 Complex carcinoma
- 1.3 Simple carcinoma
 - 1.3.1 Tubulopapillary carcinoma
 - 1.3.2 Solid carcinoma
 - 1.3.3 Anaplastic carcinoma
- 1.4 Special types of carcinomas
 - 1.4.1 Spindle cell carcinoma
 - 1.4.2 Squamous cell carcinoma
 - 1.4.3 Mucinous carcinoma
 - 1.4.4 Lipid-rich carcinoma
- 1.5 Sarcoma
 - 1.5.1 Fibrosarcoma
 - 1.5.2 Osteosarcoma
 - 1.5.3 Other sarcomas
- 1.6 Carcinosarcoma
- 1.7 Carcinoma or sarcoma in benign tumor

2 Benign Tumors

- 2.1 Adenoma
 - 2.1.1 Simple adenoma
 - 2.1.2 Complex adenoma
 - 2.1.3 Basaloid adenoma
- 2.2 Fibroadenoma
 - 2.2.1 Low-cellularity fibroadenoma
 - 2.2.2 High-cellularity fibroadenoma
- 2.3 Benign mixed tumor
- 2.4 Duct papilloma

3 Unclassified Tumors

4 Mammary Hyperplasias/Dysplasias

- 4.1 Ductal hyperplasia
- 4.2 Lobular hyperplasia
 - 4.2.1 Epithelial hyperplasia
 - 4.2.2 Adenosis
- 4.3 Cysts
- 4.4 Duct ectasia
- 4.5 Focal fibrosis (fibrosclerosis)
- 4.6 Gynecomastia

Tabelle 1 Darstellung der histologischen Klassifikation von Mammatumoren des Hundes gemäß WHO-Richtlinien (1999)

2.1.4.1 Epitheliale Tumoren

Epitheliale Tumoren machen mit Abstand den größten Anteil caniner Mammatumoren aus. Ihnen werden alle Tumoren zugeordnet, in deren Strukturen (papilläre, tubuläre, alveoläre) Drüsenepithel differenziert werden kann. Man bezeichnet sie als Adenome (benigne) oder Adenokarzinome (maligne). Liegen Drüsenstrukturen nur noch zu einem geringen Anteil vor oder fehlen diese gänzlich, so spricht man von soliden Karzinomen. Anaplastische Karzinome liegen bei überwiegend undifferenzierten Tumoren mit fehlender Drüsenstruktur, die sich durch vorwiegend anaplastische epitheliale Zellen auszeichnen, vor.

Ist neben sekretorischem Epithel auch Myoepithel neoplastisch entartet, werden die Tumoren als komplexes Adenom (benigne) bzw. komplexes Karzinom (maligne) bezeichnet (Gutberlet, Wey et al. 1998; Kessler 2005).

2.1.4.2 Mesenchymale Tumoren und Karzinosarkome

Der Tumor besteht im Falle eines Fibroms oder Sarkoms ausschließlich aus mesenchymalen Anteilen. Diese Tumorformen, bei denen Osteo- und Fibrosarkome die häufigsten Tumoren darstellen, machen nur etwa 3% der caninen Gesäugetumoren aus.

Von den Tumoren, die aus epithelialen und mesenchymalen Zellen nebeneinander bestehen, werden bei der Hündin in den meisten Fällen Fibroadenome (benigne), benigne Mischtumoren und sehr selten Karzinosarkome diagnostiziert (Kessler 2005).

2.2 Tumorbiologie von Karzinomen der Mamma

Um einen Überblick über die Karzinogenese, d.h. die Entstehungsmechanismen von Tumoren (Mammatumoren), zu geben, soll im Folgenden auf die Tumorbiologie eingegangen werden.

Das biologische Verhalten spontaner caniner Mammakarzinome ist mit der Tumorbiologie spontaner Karzinome der humanen Brustdrüse vergleichbar. Daher lassen sich Ergebnisse humaner Studien zu diesem Thema auf den Hund übertragen (Vail and MacEwen 2000).

Die Entstehung von Tumoren ist immer durch eine unkontrollierte, zelluläre Proliferation begründet.

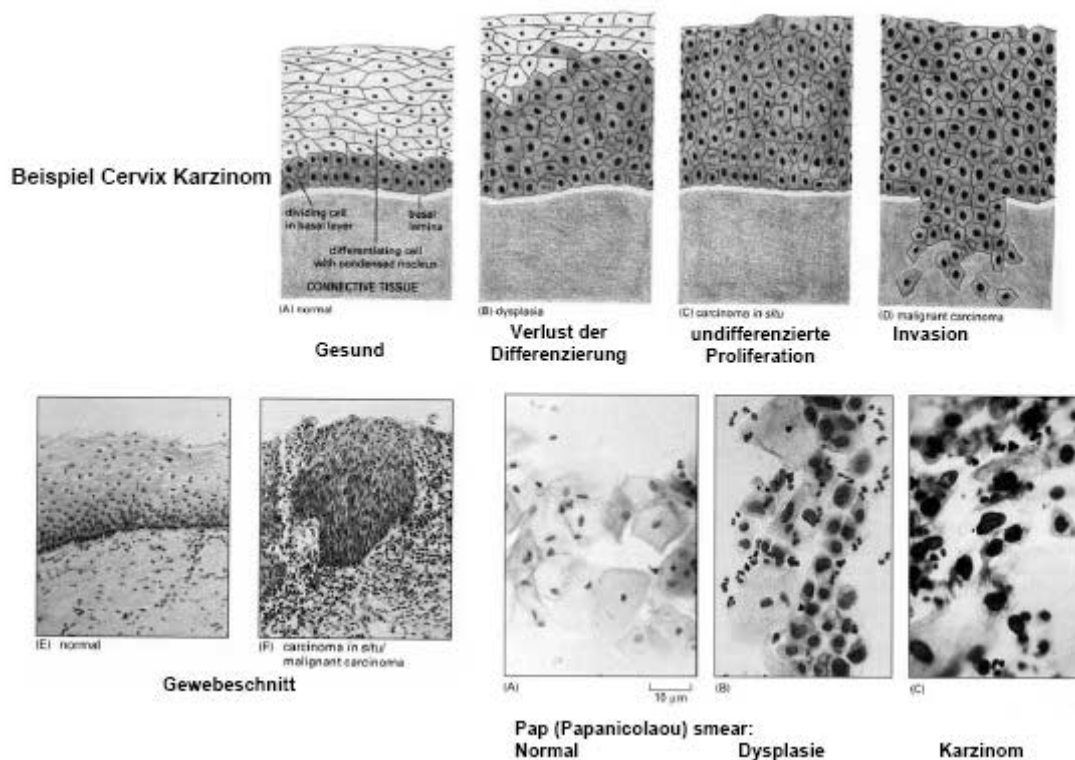


Abbildung 2 Tumorentstehung. Morphologie

Im Rahmen der Karzinogenese sind in vielen Fällen drei eng miteinander verknüpfte biologische Regulationsmechanismen dysreguliert und daher von großer Bedeutung: die Regulationsmechanismen des Zellzyklus (1.), der Apoptose (2.) und der Zelldifferenzierung (3.) (Corn and El-Deiry 2002). In normalen und ausgereiften, adulten Geweben, die dadurch charakterisiert sind, dass sie sich regelmäßig selbst erneuern (z.B. Darm-/Lebergewebe), besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und Zelluntergang durch programmierten Zelltod (Apoptose) (Kerr, Wyllie et al. 1972; Meier, Finch et al. 2000; Evan and Vousden 2001). Beide Phänomene werden durch spezifische, komplexe Regulationsmechanismen streng kontrolliert (Krammer, Behrmann et al. 1994; Daniel 2000). Ihre Bedeutung im Rahmen der Karzinogenese von benignen und malignen Tumoren wurde in der Literatur vielfach beschrieben (Tsujiimoto, Finger et al. 1984; Vaux, Cory et al. 1988; Burns, Kemp et al. 1991; Yonish-Rouach, Resnitzky et al. 1991; Soengas, Alarcon et al. 1999). Durch die ungehemmte Stimulation von zellzyklusaktivierenden Signalwegen wird die Entstehung von Tumoren ebenso gefördert wie durch eine Inaktivierung von den Zelltod (Apoptose) induzierenden Signalwegen (Wyllie, Bellamy et al. 1999). Maligne Neoplasien im Bereich der Brustdrüse zeigen genannte Störungen der Proliferations- und/oder der

Apoptosemechanismen. Häufig folgt auf initiale, transformierende genetische Ereignisse maligner Tumoren eine Akkumulation weiterer, sekundärer genetischer Veränderungen, die in der genetischen Instabilität des Tumors begründet ist (Hoeijmakers 2001). Hieraus resultiert in vielen Fällen ein verstärkter Verlust der Proliferationskontrolle und führt zu erhöhter Apoptose-Resistenz. Diese Veränderungen werden im Rahmen der Tumorprogression beobachtet, das heißt bei der Entstehung von epithelialen Tumoren mit höherem Malignitätsgrad und Therapieresistenz, zum Beispiel infolge einer Chemo- oder Strahlentherapie.

Die Mechanismen der Karzinogenese sind Thema zahlreicher humaner Forschungsarbeiten, deren Ergebnisse sich bisher zum Teil in veterinärmedizinischen Studien bestätigen und auf unterschiedliche Spezies übertragen ließen. Die Grundlage der vorliegenden Arbeitshypothese bilden jedoch im Wesentlichen humane Forschungsarbeiten, da die Mechanismen der Karzinogenese von Mammatumoren speziesübergreifend, insbesondere im Hinblick auf Caniden, bisher nur unzureichend beschrieben wurden. Des Weiteren ist bekannt, dass spontane humane und spontane canine Mammakarzinome große Ähnlichkeiten in ihrem biologischen Verhalten zeigen (Vail and MacEwen 2000).

Bei den meisten, wenn nicht bei allen, humanen Tumoren finden sich Veränderungen in den Kontrollmechanismen des G1/S-Phasenübergangs des Zellzyklus (Malumbres and Carnero 2003). Genannte Veränderungen sind insbesondere bei sogenannten Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen zu finden (Corn and El-Deiry 2002). Onkogene ermöglichen den Übergang einer Zelle in die nächste Zellzyklusphase (Positivregulation) an den Kontrollpunkten (Checkpoints) des Zellzyklus, während Tumorsuppressorgene an den Checkpoints den Übertritt einer Zelle in die nächste Zellzyklusphase verhindern können (Negativregulation). Bei den Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren (CKIs) p21 und p27 handelt es sich um putative Tumorsuppressoren. Onkogene gehören zum Erbgut einer Zelle und werden bei Einwirkung von Mutagenen aus ihren Vorstufen, den Proto-Onkogenen, gebildet. Sie fördern den Übergang von normalem Wachstumsverhalten einer Zelle zum ungebremsten Tumorwachstum. Tumorsuppressorgene hingegen kodieren Proteine, die den Zellzyklus und somit die Tumorentstehung kontrollieren. Der Fokus dieser Arbeit ist auf die Untersuchung der CKIs p21 und p27 gerichtet, die als putative Tumorsuppressorgene gelten. Sie sind Thema zahlreicher humanmedizinischer

Forschungsarbeiten, wurden jedoch spezieübergreifend, besonders im Fall der Caniden, bisher unzureichend untersucht und beschrieben.

Es ist bekannt, dass CKIs eine wichtige Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus übernehmen (siehe 2.3). Im Folgenden soll daher auf den Zellzyklus eingegangen werden, der eine essentielle Grundlage zum Verständnis der Funktion der CKIs p21 und p27 darstellt, welche Thema dieser Arbeit sind.

2.3 Der Zellzyklus

2.3.1 Zusammenfassung

Die Vermehrung einer jeden Zelle setzt die Replikation wesentlicher Zellkomponenten und die gleichmäßige und vollständige Weitergabe dieser an zwei entstehende Tochterzellen voraus (Tessema, Lehmann et al. 2004). Dies erfolgt in einem streng kontrollierten Prozess, der als Zellzyklus bezeichnet wird. Die Verdoppelung der DNA als Träger der genetischen Information und ihre anschließende Aufteilung in zwei vollständige Kopien kann als zentraler Vorgang des Zellzyklus angesehen werden.

Im Zellzyklus erfolgt die oben beschriebene Zellvermehrung in vier unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Die Replikation der DNA und damit die Verdoppelung des Chromosomensatzes finden in der Synthese- oder S-Phase statt. Es schließen sich die Trennung der identischen Schwesterchromatide und ihre Verteilung auf zwei Tochterkerne in der Mitosephase an. Zwischen diesen beiden Phasen liegen zwei sogenannte Gap-Phasen: die präreplikative G1(Gap1)-Phase und die prämitotische G2(Gap2)-Phase. Die Mitose ist normalerweise mit der Teilung der Zelle (Zytokinese) verknüpft und wird dann als M-Phase bezeichnet. Die Replikation des Genoms und die Mitose sind in den meisten eukaryotischen Zellen alternierende und voneinander abhängige Vorgänge. So kann die Mitose erst dann erfolgen, wenn die DNA vollständig verdoppelt ist. Umgekehrt kann die Replikation erst nach erfolgter Mitose erneut initiiert werden. Die geordnete Abfolge des Zellzyklus kann laut HARTWELL et al. und WEINERT (Hartwell and Weinert 1989; Weinert 1997) durch zwei alternative Mechanismen sichergestellt werden: Zum einen besteht die Möglichkeit einer Substrat-Produkt-Beziehung, indem das Produkt eines Ereignisses das Substrat eines später folgenden Ereignisses darstellt. So setzt zum Beispiel die ausreichende Synthese von Desoxynukleotiden für die DNA-Replikation eine

Aktivierung der hierfür notwendigen Enzyme in der späten G1-Phase voraus. Zum anderen wird die Abhängigkeit zweier Prozesse, die anderweitig nicht miteinander in Verbindung stehen, durch biochemische Signalwege erreicht. Diese Signalwege werden als Checkpoints bezeichnet. So wird beispielsweise am „DNA replication checkpoint“ sichergestellt, dass die Replikation abgeschlossen ist, bevor die Mitose eingeleitet wird. Weitere, sogenannte „DNA damage checkpoints“ befinden sich am G1/S-Zellzyklusphasenübergang (G1-Phase), am Übergang von der G2- zur M-Phase (G2-Phase) und innerhalb der S-Phase (Molinari 2000). Die Initiation der Replikation wie auch der Beginn der Mitose hängen von der Integrität der DNA ab. Die „DNA damage checkpoints“ lösen bei detektiertem DNA-Schaden den Arrest des Zellzyklus in der G1- oder G2-Phase aus oder erwirken eine Verlangsamung der S-Phase. So werden die Beseitigung und die Reparatur von DNA-Schäden ermöglicht, bevor diese in der Replikation zu Mutationen führen oder in der Mitose an Tochterzellen weitergegeben werden können. Die Gap-Phasen haben weitere wichtige regulatorische Funktionen. Ist zum Beispiel das Größenwachstum der Zelle nicht abgeschlossen oder erhält sie kein entsprechendes Proliferationssignal, wird die Zelle den Zellzyklus mit der frühen G1-Phase beenden und in ein Ruhestadium (Nichtteilungsstadium), die sogenannte G0-Phase übergehen. Gleichermaßen verhält sich die Situation, wenn die Zelle durch ein antimitogenes Signal geschützt wird oder kein ausreichendes Differenzierungsstadium erreicht hat (Molinari 2000). Die Checkpoints leisten somit einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität (Weinert 1997; Pruri, MacLachlan et al. 1999).

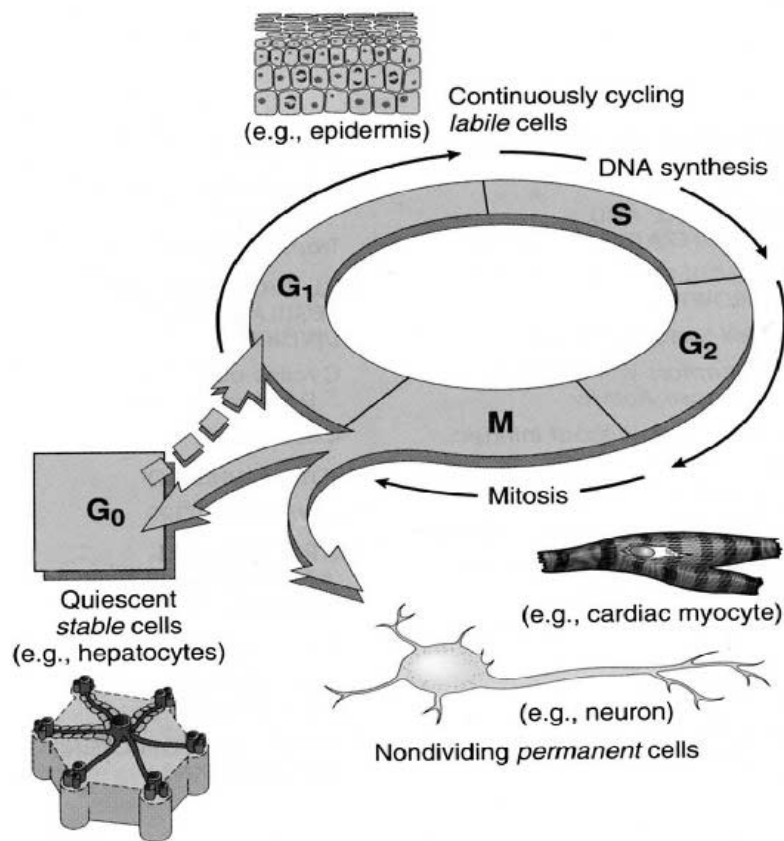


Abbildung 3 Der Zellzyklus. In Robbins: Pathologic Basis of Disease (Cotran, Kumar et al. 1999)

Das Verständnis der Funktion von Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren und der Regulation des Zellzyklus (siehe Abbildung 3) durch die CKIs p21 und p27 setzt den Einblick in die Hauptkontroll- und -regulationsmechanismen des Zellzyklus voraus. Dieser Einblick soll exemplarisch durch die anschließende Erläuterung der einzelnen Zellzyklusregulatoren sowie durch die Kontrollmechanismen am Beispiel des G₁/S-Zellzyklusphasenübergangs gegeben werden.

2.4 Kontrolle und Regulation des Zellzyklus

2.4.1 Allgemeines

Wesentliche Erkenntnisse zur Regulation der Proliferation im Rahmen des Zellzyklus wurden zunächst in Hefezellen gewonnen, vor allem der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* (Kuntzel, Schulz et al.

1996; Stern and Nurse 1996; Moser and Russell 2000). Defektmutanten dieser Eukaryonten führten zur Identifizierung der Cycline als Motor des Zellzyklus. Die Expression dieser Proteine oszilliert. In bestimmten Phasen des Zellzyklus werden spezifische Cycline hoch- oder herunterreguliert (Hunt 1991). Cycline (Johnson and Walker 1999) kontrollieren die Enzymaktivität Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK) (siehe 2.4.2), die über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus koordinieren (Hengstschlager, Braun et al. 1999; Li and Blow 2001). Für die Entdeckung der Cycline erhielten LELAND H. HARTWELL, R. TIMOTHY HUNT und PAUL M. NURSE im Jahr 2001 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie und legten hiermit den Grundstein für zahlreiche Forschungsarbeiten, die in den letzten Jahren die Bedeutung des Zellzyklus und der Zellzykluskontrolle im Rahmen der Karzinogenese untersucht und belegt haben. Die Beispiele der untersuchten und, besonders im Bereich der Zellzykluskontrolle, beeinflussten Gene sind so zahlreich, dass die Krebserkrankung mitunter als „Cell-Cycle-Disease“ (Erkrankung des Zellzyklus) beschrieben wurde (Bartek, Lukas et al. 1999).

Die Kontrolle und die Regulation des Zellzyklus finden an bestimmten Punkten, den „Checkpoints“ des Zellzyklus, statt. An diesen Kontrollpunkten befinden sich Signaltransduktionskaskaden mit regulatorischer Funktion, durch welche die Reihenfolge und der zeitliche Ablauf der Zellzykluspassage vermittelt werden (Malumbres and Barbacid 2001).

Resultat der Signaltransduktionskaskaden ist auf der einen Seite eine Aktivierung der Zellzykluspassage, auf der anderen Seite kommt es unter bestimmten Umständen zu einer Hemmung und Inaktivierung der Zellzykluspassage und letztlich zur Ausschleusung der Zelle aus dem Zellzyklus und zur Einleitung der Apoptose (Massague 2004).

2.4.2 Cyclin-abhängige Cyclinkinasen als Schlüsselenzyme der Zellzyklusregulation

Die Positivregulation und somit das Fortschreiten des Zellzyklus werden durch Cyclin-abhängige Cyclinkinasen (Cyclin-dependent kinases, CDKs) vermittelt. Sie stellen die zentralen Elemente des molekularen Kontrollsystems dar, welches den geordneten und störungsfreien Ablauf des Zellzyklus sichert (Sherr 1996; Morgan 1997; Planas-Silva and Weinberg 1997; Ekholm and Reed 2000; Pines and Rieder

2001). CDKs *per se* sind katalytisch inaktiv und werden im Verlauf des Zellzyklus phasenspezifisch aktiviert und inaktiviert, wodurch der Übergang der Zelle in die nachfolgende Zellzyklusphase ermöglicht wird. Um katalytische Aktivität zu erlangen, müssen die CDKs mit einer regulatorischen Untereinheit aus der Familie der Cycline assoziieren (siehe Abbildung 4) (Massague 2004). So entstehen Komplexe (Holoenzyme) aus einer katalytischen (CDK) und einer regulatorischen Untereinheit (Cyclin).

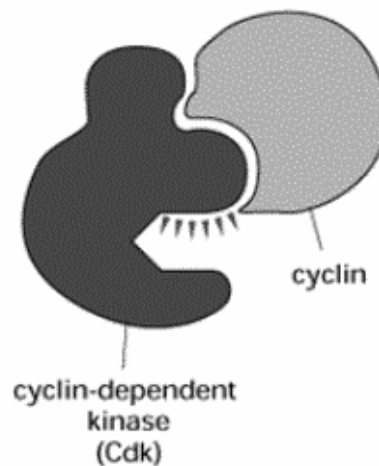


Abbildung 4 Zwei Schlüsselkomponenten der Zellzykluskontrolle. Ein Komplex aus einem Cyclin und einer Cyclin-abhängigen Kinase übernimmt als Proteinkinase spezifische Funktionen der Zellzyklussteuerung. Ohne sein Cyclin ist die Cyclinkinase inaktiv (Alberts and Johnson 2002).

Unterschiedliche Cycline übernehmen spezifisch für jede Zellzyklusphase die regulatorische Funktion. In der G1-Phase kommen die D-Cycline vor, die E- und A-Cycline in der S-Phase und in der M-Phase die B- und A-Cycline (siehe Abbildung 5) (Murray 2004).

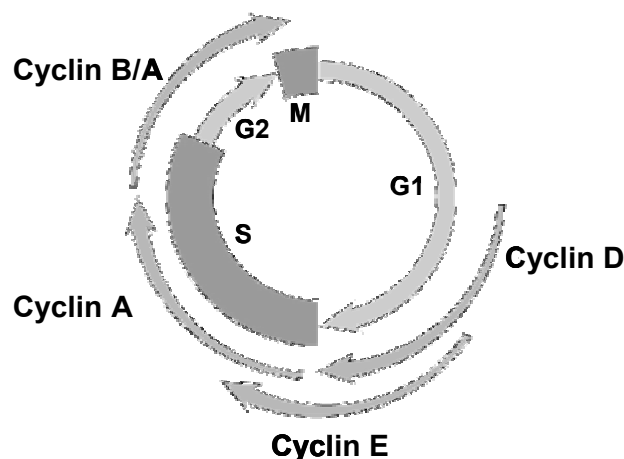


Abbildung 5 Phasenspezifität der Cycline im Verlauf des Zellzyklus

Das zyklische Auftreten der Cycline wird einerseits durch transkriptionelle Aktivierung der Cyclin-codierenden Gene und andererseits durch Ubiquitin-vermittelte Degradation dieser Proteine gesteuert (siehe Abbildung 6) (Morgan 1996).

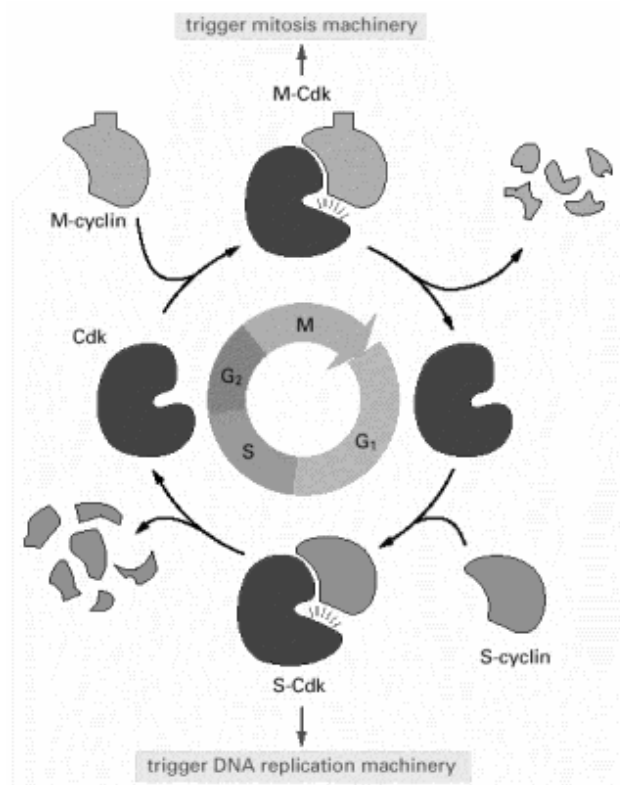


Abbildung 6 Vereinfachte Darstellung der Zellzykluskontrolle. CDKs binden sukzessive unterschiedliche Cycline, um die unterschiedlichen Abschnitte des Zellzyklus zu steuern. Die CDK-Aktivität wird durch die CDK-Degradation determiniert. Zur Vereinfachung sind nur die S-Phase-Cycline (S-cyclin) und M-Phase-Cycline (M-cyclin) dargestellt, die jeweils mit einer einzigen Cyclin-abhängigen Kinase interagieren; die hieraus entstehenden Cyclin-CDK-Komplexe werden als S-CDKs and M-CDKs bezeichnet (Alberts and Johnson 2002).

Die Cyclin-abhängigen Cyclinkinasen, welche die katalytische Untereinheit der Holoenzyme darstellen, gehören zur Serin/Threonin-Proteinfamilie. Ihre Aktivität wird durch zahlreiche Regulationsmechanismen gesteuert (Lee and Yang 2001). Es finden CDK-aktivierende Mechanismen (Positivregulationen) und CDK-hemmende Regulationen (Negativregulationen) statt. Zusätzlich zur Aktivierung der CDKs durch die Bindung eines phasenspezifischen Cyclins (siehe Abbildung 4, Abbildung 5 und Abbildung 6) wird ihre Aktivität durch die Phosphorylierung des sogenannten T-loop-Threonins durch die CDK-aktivierende Kinase (CAK) (siehe Abbildung 8) erhöht. Des Weiteren werden die CDKs durch Dephosphorylierungen an bestimmten Aminosäureresten (Threonin14/tyrosine15) aktiviert (siehe Abbildung 7).

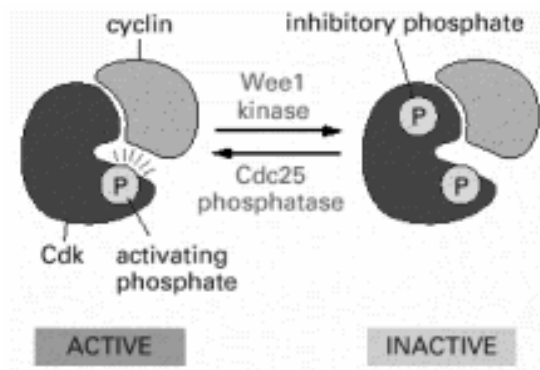


Abbildung 7 Regulation der CDK-Aktivität durch inhibitorische Phosphorylierung. Der aktive Cyclin-CDK-Komplex wird durch die Wee1-Kinase nahe des aktiven Zentrums phosphoryliert und hierdurch inaktiviert. Durch eine Dephosphorylierung (durch die Kinase Cdc25) geht der Cyclin-CDK-Komplex wieder in seinen aktiven Zustand über (Alberts and Johnson 2002).

Den aktivierenden Regulationsmechanismen stehen die negativ regulierenden Mechanismen gegenüber: 1. die Bindung von Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren (CKIs) (siehe Abbildung 10), 2. die Dephosphorylierung durch CDK-assoziierte Proteinphosphatasen (KAP) sowie 3. die Phosphorylierung durch WEE1-ähnlichen Kinasen (siehe Abbildung 7) (Tessema, Lehmann et al. 2004).

Die Signaltransduktionskaskade wird aktiviert und bremst die Zellzykluspassage, sobald eine Zellzyklusphase nicht abgeschlossen oder fehlerhaft verlaufen ist (Paulovich, Toczyski et al. 1997).

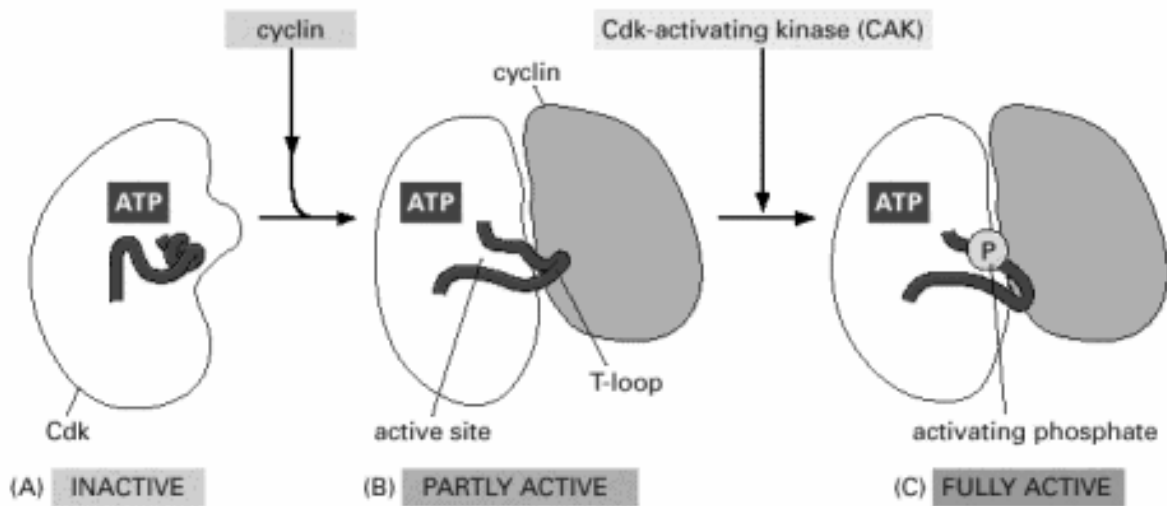


Abbildung 8 Schematische Darstellung der CDK-Aktivierung. Diese Abbildung basiert auf den röntgenkristallographisch ermittelten Kenntnissen der dreidimensionalen Struktur von humanem Cdk2. Gezeigt ist die Lokalisation von gebundenem ATP. Das Enzym wird in drei Stadien dargestellt. (A) Im inaktiven Zustand, ohne gebundenes Cyclin, das aktive Zentrum wird von einer Region des Proteins, des sog. „T-loop“ (T-Schleife: rot dargestellt), blockiert. (B) Durch die Bindung eines Cyclins kommt es zur Lösung des T-loops vom aktiven Zentrum, wodurch Cdk2 partiell aktiviert wird. (C) Aus einer weiteren Phosphorylierung des Cdk2 an einem Threoninrest des T-loops resultiert eine Konformationsänderung der T-Schleife und das Enzym erhält seine volle Aktivität. Hierdurch erhält das Enzym die Fähigkeit, seine Proteinsubstrate zu binden (Alberts and Johnson 2002).

Die Gegenspieler der Cyclin/CDK-Komplexe stellen die Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren (CKIs) dar. Sie üben zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mechanismen einen essentiellen hemmenden Effekt auf die Aktivität der Cyclin/CDK-Komplexe aus. Bleibt dieser hemmende Effekt der CKIs auf die Cyclin/CDK-Komplexe aus, so zeigen sich elementare Dysregulationen im Zellzyklusverlauf. Diese Dysregulationen, begründet in einer fehlenden oder einer Dysfunktion der CKIs (wie p21 und p27), sind in der Karzinogenese epithelialer Tumoren von großer Bedeutung. In der humanmedizinischen Forschung wurde das pathogenetische Grundprinzip der Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren in zahlreichen Studien untersucht und beschrieben (Nakayama 1998; Martin-Caballero, Flores et al. 2001; Philipp-Staheli, Payne et al. 2001; Shibata, Yoshidome et al. 2001; Choi, Tucker et al. 2003), während dies in der veterinärmedizinischen Forschung nicht der Fall ist. Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Analyse der pathogenetischen Grundprinzipien der CKIs, insbesondere p21 und p27, in der

Karzinogenese caniner Mammatumoren zu leisten. Hierzu folgt unter Punkt 2.4.3 die Charakterisierung der CKIs in Struktur und Funktion.

2.4.2.1 Die G1-Phase des Zellzyklus

Zunächst soll jedoch eine Beschreibung der G1-Phase des Zellzyklus folgen. Am Beispiel dieser Zellzyklusphase sollen die CKIs im funktionellen Kontext zu den unter 2.4.2 aufgeführten Regulatoren beschrieben und ihre Rolle im Rahmen des Zellzyklus verdeutlicht werden.

Die G1-Phase des Zellzyklus stellt die einzige Phase dar, in der eine Zelle durch extrazelluläre Proliferationssignale beeinflusst werden kann. Hierzu gehören mitogene Signale, die zum Eintritt der Zelle in den Zellzyklus bzw. zu dessen Fortschreiten führen. Des Weiteren sind antiproliferative Signale von Bedeutung, durch die der Zellzyklus gestoppt wird und/oder die Zelle den Zellzyklus verlässt (Tessema, Lehmann et al. 2004). Über das Verlassen des Zellzyklus oder den Übergang in die nächste Zellzyklusphase wird am G1/S-Checkpoint entschieden. Er wird auch als Restriktionspunkt (R-Punkt) bezeichnet. Nach Passage des Restriktionspunktes nehmen extrazelluläre Signale keinen Einfluss mehr auf das Schicksal der Zelle, und der Zellzyklus wird bis zum Ende fortgesetzt (Sherr 2000).

Die wichtigsten Regulatoren des Zellzyklus stellen die unter 2.4.2 beschriebenen Familien der Cycline, die Cyclin-abhängigen Cyclinkinasen (CDKs) und deren Substratproteine (siehe 2.4.2), sowie die Familie der Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren (siehe 2.4.3) und die Retinoblastom-Familie dar (Gali-Muhtasib and Bakkar 2002).

Für die G0-Phase und die frühe G1-Phase ist eine geringe Aktivität von Cyclin-abhängigen Cyclinkinasen (CDKs) charakteristisch. Diese ist durch eine hohe Aktivität von Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren (CKIs) und eine gleichzeitig niedrige Cyclin-Konzentration bedingt. Es liegt eine Bindung des Transkriptionsfaktors E2F am Retinoblastomprotein (pRb) vor, welches ein Tumorsuppressorgen darstellt (siehe Abbildung 9). Im gebundenen Zustand ist dieser Transkriptionsfaktor inaktiv. Im ungebundenen Zustand bewirkt E2F die Transkription seiner Targetgene, welche für die DNA-Replikation von entscheidender Bedeutung sind (Molinari 2000). Bei einem adäquaten, extrazellulären Proliferationssignal erfolgen die Akkumulation von D-Cyclinen (durch vermehrte Expression und gleichzeitig verminderte Proteolyse) und die Bildung von partiell aktiven Komplexen (Holoenzyme) aus je einem Cyclin und je einer Cyclin-

abhängigen Kinase CDK4 bzw. CDK6. Die entstandenen Holoenzyme werden durch die Cyclin-aktivierende Kinase (CAK) phosphoryliert und erhalten hierdurch ihre volle Aktivität (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003). Die aktivierten CDK4/6-Cyclin D-Holoenzyme führen durch eine Phosphorylierung des pRb zur Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors (siehe Abbildung 9) (Bartek, Lukas et al. 1999; Bartek and Lukas 2001; Lin, Lin et al. 2001). Hieraus resultiert die Transkription von Proteinen, die für den Übergang in die S-Phase essentiell sind (Gutierrez, Ramirez-Parra et al. 2002). Aktivierte CDK2/Cyclin-E- und CDK4/6-Cyclin-D-Komplexe bewirken gemeinsam die vollständige Inaktivierung des pRb (Sherr and Roberts 1999; Malumbres and Barbacid 2001). Bei fehlendem adäquaten Proliferationssignal durch antiproliferative Signale oder bei DNA-Schäden wird der G1/S-Checkpoint aktiviert. Hierdurch kommt es zur Unterbrechung des Zellzyklus. Die Regulatoren des G1/S-Checkpoints, die den Übergang einer Zelle in die sich anschließende Zellzyklusphase unterbinden können und somit Gegenspieler der Cyclin/CDK-Komplexe darstellen, sind die Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren (CKIs). Es werden die INK4-Familie (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}) und die CIP/KIP-Familie (p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2}) unterschieden (siehe 2.4.3). Die regulatorische Funktion der INK4-Familie ist auf die G1-Phase beschränkt, während die CIP/KIP-Familie in allen Zyklusphasen CKI-Funktion übernimmt (Sherr and Roberts 1999).

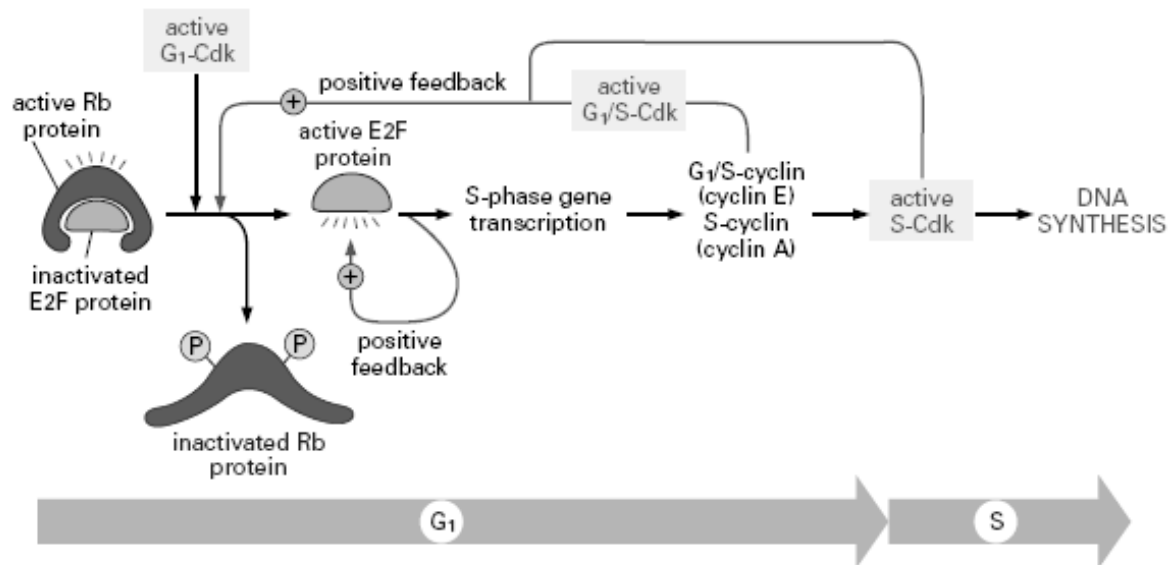


Abbildung 9 Mechanismen des G1/S-Phasenübergangs. Aktive G1-Cyclin/CDK-Komplexe (Cyclin D / CDK 4/6) initiieren die Phosphorylierung des pRb. Durch die resultierende Inaktivierung von Rb kommt es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. Dieser aktiviert die Transkription von S-Phase-Genen sowie des G1/S-Cyclins (Cyclin E) und des S-Cyclins (Cyclin A). Es bilden sich die G1/S-Cyclin/CDK-Komplexe und S-Cyclin-CDK-Komplexe. Hierdurch resultiert eine Positiv-Rückkopplung (positive feedback loop), durch die die Rb-Phosphorylierung induziert wird. Eine weitere positive Rückkopplung erfolgt durch den E2F-Transkriptionsfaktor, der die Transkription des E2F-Gens aktiviert (Alberts and Johnson 2002).

Das Prinzip der übrigen Zellzyklusphasen bzw. Zellzyklusphasenübergänge ähnelt dem Prinzip der G1-Phase bzw. dem G1/S-Phasenübergang. Der Zellzyklusphasenübergang G1/S spielt jedoch aufgrund der großen Anzahl regulatorisch beteiligter Schlüsselenzyme und deren möglicher Beeinträchtigung eine wichtige Rolle in der humanen Karzinogenese (Malumbres and Carnero 2003; Massague 2004). So liegt es nahe, dass ein auftretender Mangel an oder eine Dysregulation von hier beteiligten CKIs einen proliferativen Effekt auslösen und bei Entstehung von humanen sowie caninen Mammakarzinomen eine Rolle spielen könnten (Massague 2004).

2.4.3 Inhibitorische Untereinheiten Cyclin-abhängiger Kinasen

Als putative Tumorsuppressoren spielen Cyclin-abhängige Cyclinkinase-Inhibitoren (CKIs) eine elementare Rolle im Rahmen der Karzinogenese epithelialer Tumoren. Sie nehmen Einfluss auf die Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen (siehe 2.4.2). Man unterscheidet bei Säugetieren zwei CKI-Familien anhand ihrer Proteinstruktur, den

Wirkmechanismen und der CDK-Spezifität: die CIP/KIP-Familie und die INK4-Familie, wobei die INK-Familie an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber aufgeführt werden soll (siehe Tabelle 2) (Carnero and Hannon 1998; Hengst and Reed 1998).

Tabelle 2 Tabellarische Darstellung der CDK-Inhibitorfamilien

	CIP/KIP-Familie	INK4-Familie
Mitglieder	p21 ^{CIP1/WAF1} , p27 ^{KIP1} , p57 ^{KIP2}	p15 ^{INK4b} , p16 ^{INK4a} , p18 ^{INK4c} , p19 ^{INK4d}
CDK-Spezifität für	CDK 1, 2, 3, 4, 5, 6	CDK 4 und CDK 6
Mechanismus der Inhibition	Bindung an den Cyclin/CDK-Komplex	Bindung an die CDK-Untereinheit
Inhibitorische Struktureinheit	CDK-Inhibitor-Domäne	Ankyrin-Repeats

Die beiden Familien der CDK-Inhibitoren bei Säugern unterscheiden sich in ihrer CDK-Spezifität und durch ihren Wirkungsmechanismus.

2.4.3.1 Die CIP/KIP-Familie

Eine besonders wichtige Rolle im Rahmen der Karzinogenese epithelialer Tumoren spielt die Dysregulation der CIP/KIP-Familie der CKIs. Zur CIP/KIP-Familie gehören die putativen Tumorsuppressoren p21^{CIP1/WAF1} und p27^{KIP1}, die durch eine ihnen gemeinsame konservierte aminoternale Domäne ein breites Spektrum von Cyclin/CDK-Komplexen inhibieren. Der Inhibitionsmechanismus der CIP/KIP-Familie wurde durch röntgenkristallographische Untersuchungen am Beispiel von p27 beschrieben. Aus der Bindung von p27 an einen Cyclin-A/CDK2-Komplex resultiert ein ternärer Komplex, in welchem p27 sowohl mit Cyclin A als auch mit CDK2 interagiert (Russo, Jeffrey et al. 1996) (siehe auch Abbildung 10).

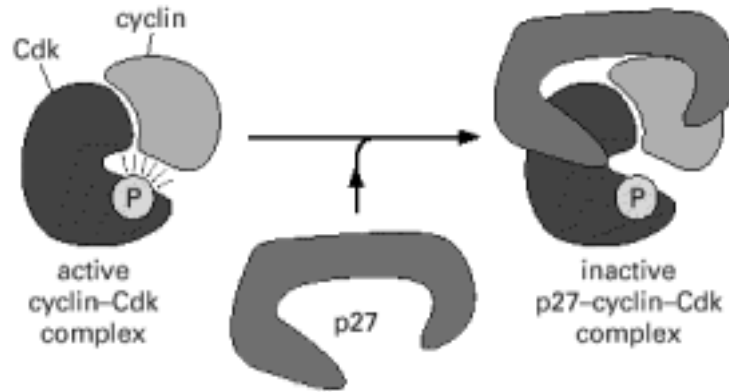


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Inhibition von Cyclin/CDK-Komplexen durch CKIs (hier am Beispiel von p27) (Alberts and Johnson 2002)

Der aminoternale Bereich von p27 bindet an Cyclin A, der carboxyterminale p27-Bereich an die aminoternale Domäne von CDK2. Hieraus resultiert eine Konformationsänderung. Zusätzlich wird die ATP-Bindungsstelle des Komplexes durch den Inhibitor blockiert. Ein analoger Inhibitionsmechanismus lässt sich für p21 im Komplex mit einem Cyclin/CDK-Heterodimer vermuten (Ekholm and Reed 2000). Durch unterschiedliche Größen und geringe Sequenzhomologien der CIP/KIP-Proteine an der carboxyterminalen Domäne und hier auftretende Protein-Protein-Interaktionen oder Modifikationen ist eine spezifische Regulation der Aktivität der einzelnen CIP/KIP-Proteine möglich (Hengst and Reed 1998).

CIP/KIP-Proteine haben zusätzlich zu ihrer Funktion als Inhibitoren auch die Fähigkeit, CDK-Komplexe zu aktivieren. Sie fördern *in vitro* die Bildung von katalytisch aktiven Cyclin-D/CDK4-Komplexen, welche an den Zellzykluscheckpoints das Fortschreiten des Zellzyklus in die folgende Zyklusphase ermöglichen. Da sie somit vermutlich als „Assembly“-Faktoren bei der Bildung von aktiven Cyclin-D/CDK4(und 6)-Komplexen beteiligt sind, besitzen die CKIs, neben ihrer Funktion als putative Tumorsuppressoren, ebenso einen onkogenen Charakter. Die CIP/KIP-Proteine tragen durch zwei weitere Funktionen zur Aktivierung von Cyclin-D/CDK4-Komplexen bei: LABAER et al. vermuteten, dass sie zur Einschleusung des heteromeren Komplexes in den Nukleus der Zelle beitragen und gleichzeitig die Stabilität der D-Cycline erhöhen (LaBaer, Garrett et al. 1997). Durch eine Studie von CHENG et al. im Jahre 1999 (Cheng, Olivier et al. 1999) wurde diese Hypothese bestätigt. Hier konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten von „Knock-out“-Mäusen, die weder p21 noch p27 exprimieren, keine detektierbaren Mengen an Cyclin-D/

CDK-Komplexen aufweisen. Es lässt sich also vermuten, dass die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse (s.o.) auch auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen lassen und die CKIs auch *in vivo* mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Funktion als Assembly-Faktoren besitzen.

Durch die Rolle der CIP/KIP-Familie beim Cyclin-D/CDK-Assembly können Effekte anderer Moleküle, die z.B. den G1/S-Phasenübergang kontrollieren, in folgenden Zusammenhang gebracht werden: In der G1-Phase steigt die Konzentration an ungebundenen CIP/KIP-Proteinen durch mitogene Stimuli an. Diese lösen sich von Cyclin-E/CDK2-Komplexen und binden an Cyclin-D/CDK4-Komplexe. Hierdurch wird die Aktivierung der bisher inhibierten Cyclin-E-CDK2-Komplexe in der späten G1-Phase ermöglicht. Bei sinkendem oder fehlendem mitogenem Signal und Einstellung der Cyclin-D-Synthese wird dieses latente „Reservoir“ von CIP/KIP-Proteinen freigesetzt. Durch Bindung der Cyclin-E/CDK2-Komplexe werden diese inhibiert und es kommt zum Zellzyklusarrest. Dieser Mechanismus wird als „CKI-Exchange“ bezeichnet und trägt maßgeblich zur Regulation von Cyclin-E/CDK2-Komplexen und auf diesem Weg zur Kontrolle des G1/S-Phasenübergangs bei (Sherr and Roberts 1999; Ekholm and Reed 2000). Im umgekehrten Fall ist ein fehlender Zellzyklusarrest Resultat einer Dysregulation des mitogenen Signals bzw. des oben beschriebenen Regulationsmechanismus. Diese Dysregulation kann einen proliferativen Effekt ausüben, der in Folge möglicherweise zelluläre Transformationen und letztlich die Bildung epithelialer Tumoren bedingt.

Aus physiologischer Sicht werden die beiden CIP/KIP-Proteine p21 und p27 als ubiquitäre, negative Regulatoren der Zellzyklusproliferation angesehen. Hierdurch werden die elementare Rolle dieser CKIs in der Kontrolle des Zellzyklusarrests und somit, im Falle einer Dysregulation, ihr prokarzinogener Charakter verdeutlicht. Die variable Expression der Inhibitoren in vielen verschiedenen Zellentypen ist die Folge unterschiedlicher, endogener und exogener, antiproliferativer Signale. p21 übernimmt vorwiegend eine Rolle bei der Kontrolle der einzelnen Checkpoints und der Induktion von Differenzierungsvorgängen (el-Deiry, Tokino et al. 1993; Dulic, Stein et al. 1998; Medema, Klompaker et al. 1998; Niculescu, Chen et al. 1998), während p27 vor allem an der Kontrolle des Restriktionspunktes beteiligt ist (Polyak, Lee et al. 1994; Toyoshima and Hunter 1994) (siehe Abbildungen 11 und 14).

Das dritte Mitglied der CIP/KIP-Familie p57, über welches bisher auch durch humane Studien nur wenig bekannt ist, soll hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

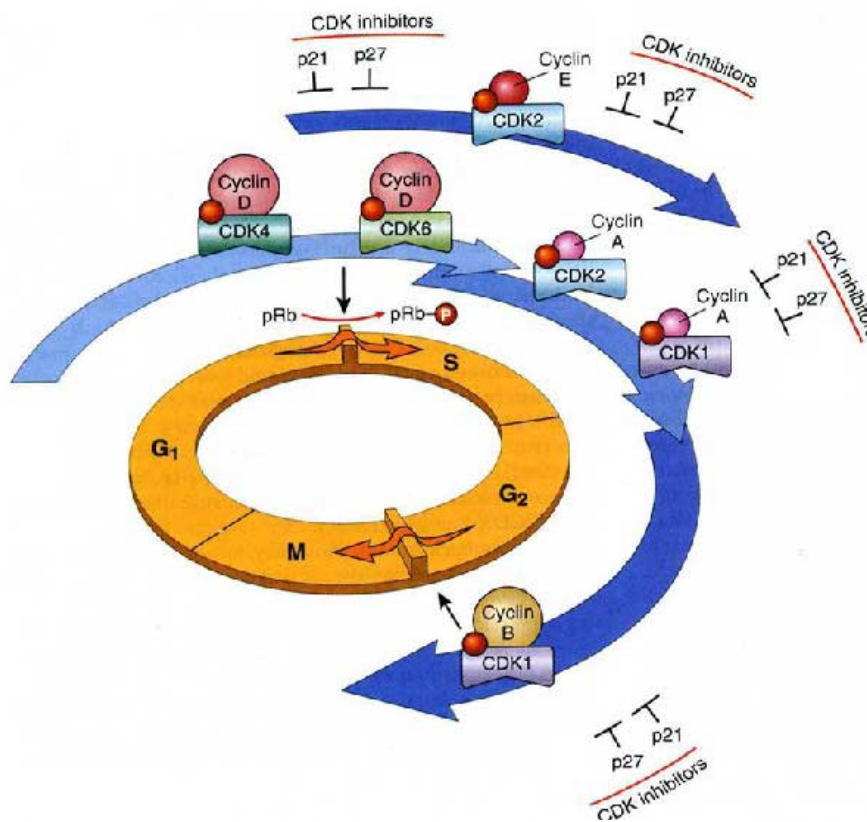


Abbildung 11 Regulation des Zellzyklus durch das Zusammenspiel von Cyclin/CDK-Komplexen und ihre CDK-Inhibitoren. In Robbins: Pathologic Basis of Disease (Cotran, Kumar et al. 1999).

2.5 Funktionen und Regulation des Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitors p21^{CIP1/WAF1}

Funktionen des CKIs p21

Bei p21^{CIP1/WAF1} handelt es sich um den am längsten bekannten CDK-Inhibitor der CIP/KIP-Familie. Obwohl er einen elementaren Faktor in der Kontrolle des Zellzyklusarrests und somit in der Karzinogenese epithelialer Tumoren darstellt, wurde er bisher bei der Spezies Hund nur unzureichend untersucht und beschrieben. Das Protein wurde beim Menschen aus Cyclin/CDK2-Immunpräzipitaten isoliert, als CDK2-bindendes Protein identifiziert und infolge dessen als CDK-Inhibitor charakterisiert (el-Deiry, Tokino et al. 1993; Gu, Turck et al. 1993; Harper, Adami et al. 1993; Xiong, Hannon et al. 1993; Noda, Ning et al. 1994). p21 gilt als Effektor des Tumorsuppressors p53 und vermittelt dessen tumorsuppressive Wirkung. Es ist an

der zellulären Antwort dieses Tumorsuppressors auf DNA-Schäden beteiligt. In p53-positiven Zellen, die gleichzeitig einen erhöhten Gehalt an p21 aufweisen, kommt es bei DNA-Schäden zum Arrest des Zellzyklus in der G1-, G2- (Niculescu, Chen et al. 1998) und der S-Phase (Ogryzko, Wong et al. 1997; Radhakrishnan, Feliciano et al. 2004). Beides gilt nicht für p53-negative Zellen (el-Deiry, Tokino et al. 1993; Dulic, Kaufmann et al. 1994).

p21 übernimmt vor allem wichtige Funktionen im Bereich der Checkpointkontrollen und ist an der Induktion von Differenzierungsvorgängen beteiligt. Der Verlust der Checkpointkontrollen wie z.B. durch eine Dysregulation der p21-Expression spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Karzinogenese. So wurde beispielsweise im Rahmen einer Studie bei p21-negativen Mäusen eine erhöhte Inzidenz spontaner Tumoren beobachtet und somit gezeigt, dass von einer bedeutenden Funktion des CKIs p21 im Rahmen der Tumorsuppression auszugehen ist (Martin-Caballero, Flores et al. 2001).

Es resultierte die Fragestellung nach der prognostischen Relevanz der p21-Expression in der humanen Karzinogenese. Bei Untersuchungen von Patienten mit primären superfiziellen Blasenkarzinomen sowie auch p53-negativen Magenkrebs-Patienten wurde im Studienverlauf bei erhöhter p21-Expression eine höhere Überlebensrate festgestellt als bei Patienten mit reduzierter p21-Expression (Migaldi, Sgambato et al. 2000; Xiangming, Hokita et al. 2000).

Während das p53-Gen eines der am häufigsten mutierten Gene humaner Tumoren darstellt (Levine 1997), werden Mutationen des p21-Lokus nur selten detektiert (Hirama and Koeffler 1995; Shiohara, Koike et al. 1997).

Neben den vorhandenen Cyclin- und CDK-Bindungsstellen (s.o.) besitzt p21 auch eine Bindungsstelle für PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) im carboxyterminalen Bereich. Es kann hiermit an PCNA, den Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase-Delta, binden, dadurch die Aktivität des Enzyms *in vitro* inhibieren und auf diesem Weg das Zellwachstum hemmen (Rossig, Jadidi et al. 2001). Neben der Inhibition von Cyclin/CDK-Komplexen könnte der PCNA-Regulationsmechanismus eine zusätzliche Möglichkeit darstellen, durch die p21 als Antwort auf DNA-Schäden die Replikation verlangsamt und der Zelle Gelegenheit zur DNA-Reparatur gibt (Vidal and Koff 2000). Diese Möglichkeit wurde durch Untersuchungen gestützt, die zeigten, dass die p21-Stabilität durch die Interaktion mit PCNA erhöht wurde (Cayrol and Ducommun 1998).

p21 übernimmt zusätzlich zur Funktion als Effektor der p53-vermittelten Antwort auf genotoxischen Stress eine wichtige Rolle bei der Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen. Während der Embryonalentwicklung wird eine gewebespezifische, p53-unabhängige p21-Expression beobachtet, die nach Verlassen des Zellzyklus und vor der Differenzierung der Zellen erfolgt (Macleod, Sherry et al. 1995; Parker, Eichele et al. 1995).

Zu Beginn der Untersuchungen des CKIs p21 im Hinblick auf die Karzinogenese humaner Mammatumoren standen zunächst dessen Fähigkeit zur Bindung von Cyclin-A/CDK2- und Cyclin-D/CDK4-Komplexen und die daraus resultierende funktionelle Inhibition dieser Komplexe im Vordergrund. Wie eingangs erwähnt, wurde p21 aus Cyclin/CDK2-Immunpräzipitaten isoliert und als CDK-Inhibitor charakterisiert (Gu, Turck et al. 1993; Xiong, Hannon et al. 1993).

Überraschenderweise wurden aber auch enzymatisch aktive Cyclin-D/CDK4/6-p21(p27)-Komplexe und Cyclin-A/CDK2-p21(p27)-Komplexe in Säugerzellen gefunden (Parry, Bates et al. 1995; Blain, Montalvo et al. 1997; Mahony, Parry et al. 1998; McConnell, Gregory et al. 1999). So zeigte sich in einigen Zellkultursystemen, dass es bei Zellen, die zur Proliferation stimuliert wurden, in der G₀-Phase gleichzeitig zur Induktion der p21-Expression kam (Li, Jenkins et al. 1994; Noda, Ning et al. 1994). Des Weiteren wurde berichtet, dass die Mehrheit der CDK4- und CDK2-Komplexe proliferierender, humaner Fibroblasten mit p21 in assoziierter Form vorliegt (Harper, Adami et al. 1993; Zhang, Xiong et al. 1993). Aus diesen Untersuchungen resultierte die Hypothese, dass Cyclin/CDK-Komplexe bei der Assoziation mit nur einem Molekül p21 weiterhin in aktivem Zustand vorliegen und erst durch die Bindung von mehr als einem p21-Molekül funktionell inhibiert werden (Zhang, Hannon et al. 1994; Harper, Elledge et al. 1995; LaBaer, Garrett et al. 1997). Die Hypothese wurde durch Studien gestützt, in denen CDK-Komplexe mit Anti-p21-Antikörpern aus Zelllysaten präzipitiert wurden, welche hiernach katalytische Aktivität zeigten. Erst bei einer p21-Zugabe im Überschuss stellte sich eine reversible Inaktivierung der Aktivität der CDK-Komplexe ein (Zhang, Hannon et al. 1994; Harper, Elledge et al. 1995). Es zeigte sich, dass die Inhibition der Cyclin-D/CDK4-p21(p27)-Komplexe bei einer 1:1:1-Stöchiometrie ausblieb (Blain, Montalvo et al. 1997; LaBaer, Garrett et al. 1997), jedoch im Unterschied hierzu Cyclin-A/CDK2-Komplexe durch equimolare Konzentrationen an p21 inhibiert werden (Hengst, Gopfert et al. 1998; Adkins and Lumb 2000). Diese reversible Inaktivierung der

Cyclin/CDK-Komplexe im Rahmen des Zellzyklus bedeutet eine direkte Steuerung von pro- als auch antiproliferativen Effekten in epithelialen Zellen.

Neben einer Resistenz der Cyclin-D/CDK-Komplexe gegen die p21-Inhibition wurde beschrieben, dass durch die Interaktion dieser Komplexe mit dem p21-CIP/KIP-Protein die Komplexaktivierung vereinfacht wird. Die Komplexaktivierung führt zum Fortschreiten des Zellzyklus und somit letztlich zur Zellproliferation. p21 übernimmt an dieser Stelle neben der Funktion als CKI eine wichtige Rolle beim Cyclin-D/CDK-Assembly (LaBaer, Garrett et al. 1997; Cheng, Olivier et al. 1999; Weiss, Joo et al. 2000). p21 zeichnet sich hierdurch möglicherweise zusätzlich zu seiner inhibitorischen Funktion durch eine proproliferative Funktion aus.

Regulation der p21-Expression

Die Regulation der Expression von p21 erfolgt auf unterschiedliche Art und Weise, jedoch vornehmlich auf Transkriptionsebene (Gartel and Tyner 1999). Neben der Induktion der p21-Expression durch das Tumorsuppressorgen p53 (Dotto 2000) nehmen auch p53-unabhängige Faktoren Einfluss auf die Expressionsrate. Hierzu zählen zum einen expressionsinduzierende Faktoren wie p202, TGF-beta und dessen Superfamilie sowie STATs (s.u.) und expressionshemmende Faktoren wie SET, HER2 und Myc. Bei p202 handelt es sich um ein Interferon-induzierbares Phosphoprotein (Datta, Li et al. 1996), welches die Expression des p21-Proteins p53-unabhängig induziert (Gutterman and Choubey 1999). Des Weiteren erfolgt eine p21-Induktion durch Aktivierung des STAT(signal transducers and activators of transcription)-Signalweges (Chin, Kitagawa et al. 1996; Bromberg and Darnell 2000; Chen, He et al. 2000).

Eine dritte hochrelevante Möglichkeit der Induktion der p21-Expression stellt der TGF- β (Transforming Growth Factor-beta)-Signalweg dar (Datto, Yu et al. 1995). Der Wachstumsfaktor TGF- β vermindert die Expression des Onkogens c-Myc (Amati 2001). Durch eine Überexpression von c-Myc kommt es zu einer Reduktion der Menge an endogener p21-mRNA und zu einer verminderten Expression eines p21-Promotor-kontrollierten Luziferase-Reportergens (Claassen and Hann 2000). So hemmt c-Myc die p21-Expression, während es TGF- β -vermittelt zu einer verminderten c-Myc-Expression kommt und hieraus die Aktivierung der p21-Transkription resultiert. Zur TGF- β -Superfamilie gehören unter anderem die Bone morphogenetic proteins (BMPs), durch deren Bindung an TGF-Rezeptoren eine

Aktivierung der SMAD-Kaskade (Transkriptionsfaktoren) erfolgt und letztlich ebenfalls Induktion der p21-Transkription resultiert (siehe Abbildung 12) (Moustakas 2002; Haudenschild, Palmer et al. 2004).

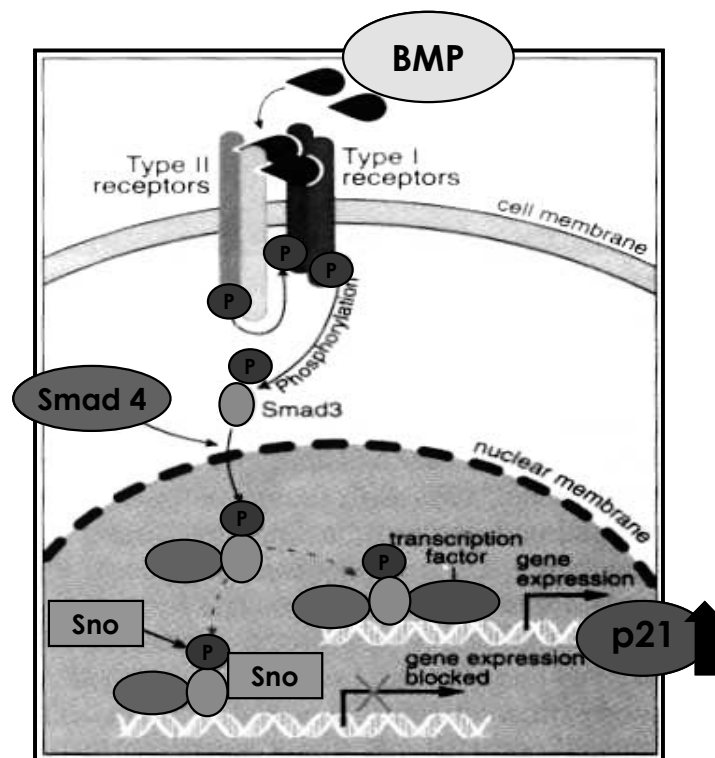


Abbildung 12 Schematische Darstellung der p21-Induktion durch BMP

Einen negativ regulierenden Effekt auf die p21-Aktivität übt neben dem oben beschriebenen c-Myc auch das sogenannte SET aus. Es handelt sich hierbei um ein Onkoprotein, das durch die Bindung an die carboxyterminale Region von p21 den inhibitorischen Effekt von p21 auf Cyclin-E/CDK2-Komplexe aufhebt (Estanyol, Jaumot et al. 1999). Einen weiteren Negativregulator von p21 stellt HER2/neu (HER2) dar (Zhou, Liao et al. 2001). HER-2-vermitteltes Zellwachstum setzt die Aktivierung von Akt, einer Serin-Threonin-Proteinkinase, voraus, welche mit p21 assoziiert und dieses an Threoninresten phosphoryliert. Aus der Threonin-Phosphorylierung resultiert die cytoplasmatische Lokalisation von p21 (Zhou, Liao et al. 2001; Winters, Leek et al. 2003). Diese Lokalisation von p21 unterbindet die inhibitorische Funktion des CKIs, während im Nukleus lokalisiertes p21 als Inhibitor fungiert. Neben HER2 beeinflusst auch Calmodulin die nukleäre oder cytoplasmatische Lokalisation von p21 (Taulés, Rodriguez-Vilarrupla et al. 1999; Rodriguez-Vilarrupla, Jaumot et al. 2005).

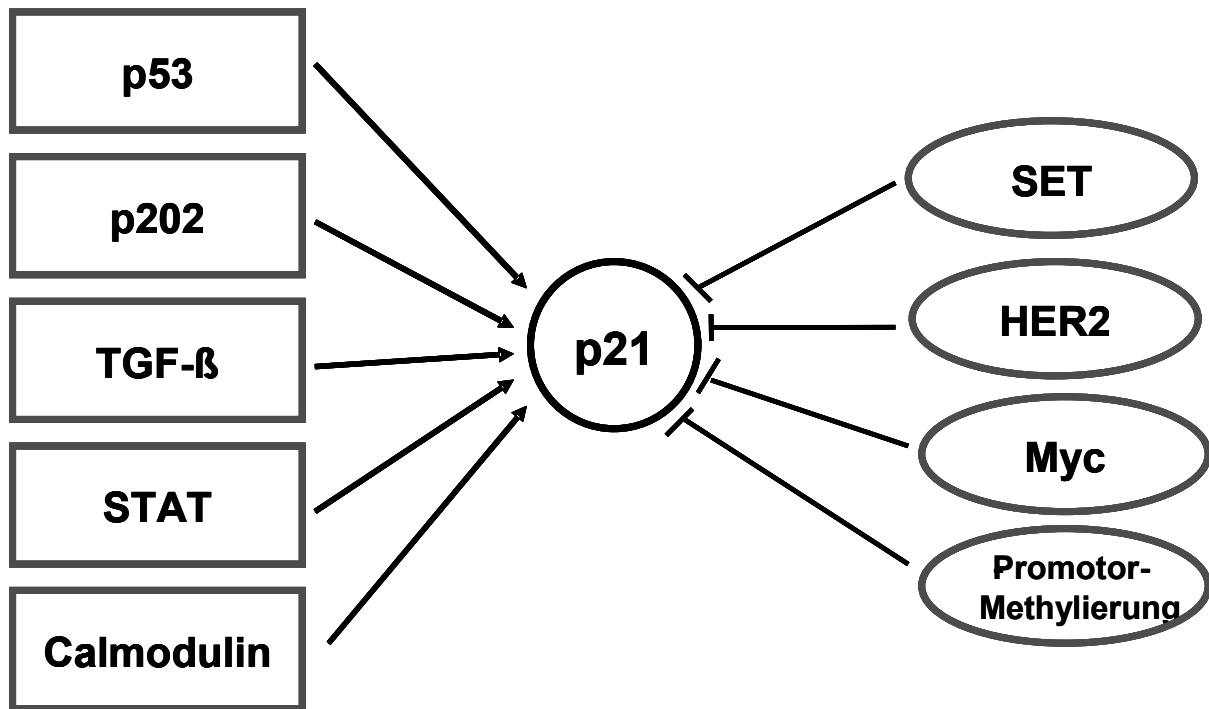


Abbildung 13 Mechanismen der Positiv- und Negativregulation der p21-Aktivität

Biologische Effekte der p21-Expression bzw. -Lokalisation

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression von p21 das Wachstum und die Entstehung von Mammakarzinomen (Shibata, Yoshidome et al. 2001), Lungenkrebs (Joshi, Chen et al. 1998) und Prostatakrebs (Eastham, Hall et al. 1995) unterdrückt. Diese Studien deuten auf die mögliche Relevanz und Anwendbarkeit des p21-Inhibitors in der Krebstherapie hin (Yang, Perkins et al. 1995).

Die Lokalisation von p21 scheint hierbei eine bedeutende Rolle in der Prognose von Krebserkrankungen zu spielen. Im Fall der cytoplasmatischen Lokalisation wirkt p21 antiapoptotisch und verhindert den Zellzyklusarrest (Heliez, Baricault et al. 2003). So deuten eine cytoplasmatische Lokalisation als auch eine höhere Expression an Gesamt-RNA (Yang, Klos et al. 2003) von p21 im Fall der Brustkrebserkrankung auf eine schlechtere Prognose in Verbindung mit geringerer Überlebensrate und erhöhter Rezidivgefahr hin (Winters, Leek et al. 2003).

Im Jahre 1998 beschrieben RITT et al. zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen des CDK-Inhibitors p21 und einer neoplastischen Erkrankung beim Hund (Ritt, Wojcieszyn et al. 1998). Einige Untersuchungen zur Expression von p21 an der Spezies Hund ergaben, dass bei caninen Neoplasien selten eine Reduktion oder ein kompletter Verlust von p21 vorkommen (Koenig, Bianco et al. 2002). In anderen Studien konnte sogar ein Anstieg der p21-Expression in

Korrelation mit einem ansteigenden Malignitätsgrad gezeigt werden (Wu, Hayashi et al. 2004). In mehreren Untersuchungen an der Spezies Hund wurde auf die entscheidende Bedeutung der Lokalisation des Proteins im Nukleus beziehungsweise im Cytoplasma der Zelle und den damit im Zusammenhang stehenden Funktionsunterschied des CDK-Inhibitors hingewiesen (Ritt, Mayor et al. 2000; Koenig, Bianco et al. 2002; Wu, Hayashi et al. 2004). Die cytoplasmatische Akkumulation von phosphoryliertem p21 verhindert einen Zellzyklusarrest, wohingegen nukleäres p21 einen Zellzyklusarrest bedingen kann.

2.6 Funktionen und Regulation des Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitors p27^{KIP1}

Funktion des CKIs p27

Der Cyclin-abhängige Cyclinkinase-Inhibitor p27 wird wie auch p21 aus physiologischer Sicht als ubiquitärer, negativer Regulator der Zellzyklusproliferation angesehen. Hierdurch werden die elementare Rolle von p27 in der Kontrolle des Zellzyklusarrests und somit, im Falle einer Dysregulation, dessen prokarzinogener Charakter verdeutlicht.

Verschiedene Arbeitsgruppen entdeckten nahezu zeitgleich p27^{KIP1} und dessen inhibitorische Funktion in G1-arretierenden Zellkulturen (Hengst, Dulic et al. 1994; Polyak, Lee et al. 1994; Slingerland, Hengst et al. 1994; Toyoshima and Hunter 1994). Das Protein ist N-terminal zu 42 % identisch zu p21 (Polyak, Lee et al. 1994; Toyoshima and Hunter 1994). p27 wurde auf genetischem Weg als Cyclin-D1-bindendes Protein identifiziert (Toyoshima and Hunter 1994). In proliferierenden Zellen wird p27 periodisch exprimiert. Die p27-Konzentration erreicht ihr Maximum während der G1-Phase, fällt mit dem Eintritt der Zellen in die S-Phase stark ab und hält ein niedriges Niveau, bis die Zellen die nächste G1-Phase erreichen (Hengst, Dulic et al. 1994; Hengst and Reed 1996; Millard, Yan et al. 1997). Des Weiteren wird p27 durch eine breite Palette antiproliferativer Signale in zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen induziert (Hengst and Reed 1996). So akkumuliert p27 zum Beispiel in Zellen, die nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch Kontaktinhibition den Zellzyklus verlassen und quieszent werden. Die Kristallographie am Beispiel von Cyclin-A/CDK2/p27-Komplexen lässt erkennen, dass p27 sowohl Cyclin A als auch CDK2 bindet (Russo, Jeffrey et al. 1996). p27 schiebt sich selbst tief ins katalytische Zentrum des Cyclin/CDK-Komplexes und

inhibiert auf diese Weise kompetitiv dessen Aktivierung durch ATP. Eine stabile Assoziation von p27 mit (in diesem Fall) Cyclin-A/CDK2-Komplexen setzt intakte Cyclin- und CDK-Bindungsstellen voraus. Tatsächlich kommen p27-Mutanten vor, die Veränderungen an einer dieser Bindungsstellen aufweisen und somit keine Komplexe binden können. Diese p27-Mutanten sind nicht in der Lage, die Akkumulation von Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel E2F/p130 zu induzieren und hierdurch die Hemmung der Transkription der E2F-Targetgene (z.B. Cyclin A, Cyclin E) zu inhibieren (Shiyanov, Hayes et al. 1997). Ebenso wie im Fall von p21 wird vermutet, dass die Inhibition der Kinaseaktivität von der p27-Stöchiometrie in Cyclin/CDK-Komplexen abhängt. Zahlreiche experimentelle Daten weisen darauf hin, dass die intrazelluläre p27-Konzentration eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Restriktionspunktes spielt:

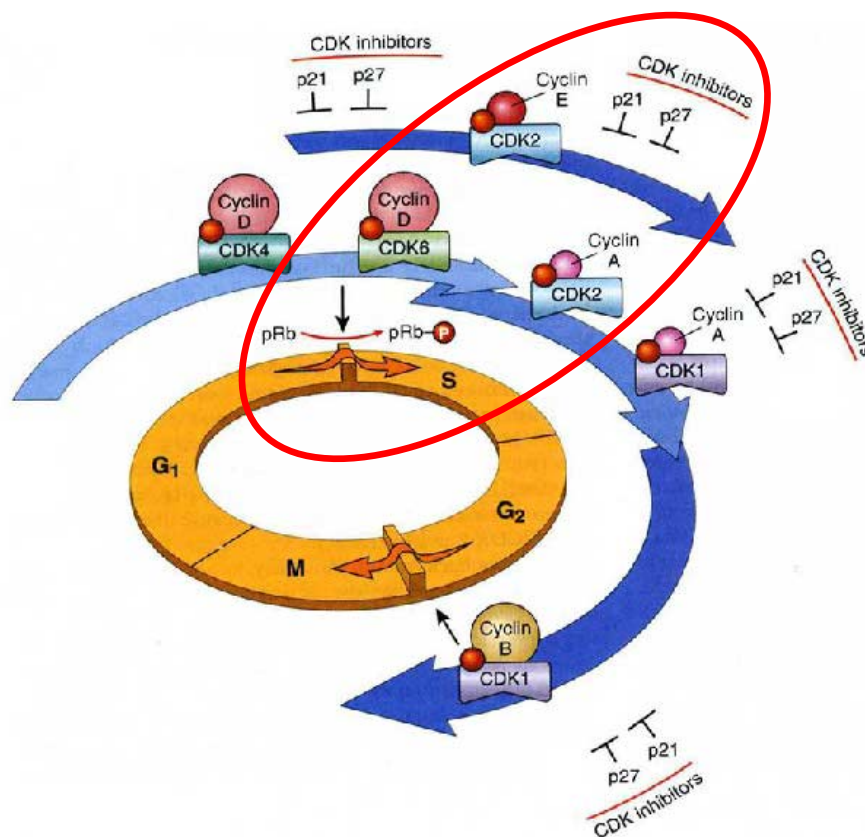


Abbildung 14 Darstellung des Restriktionspunktes des Zellzyklus. In Robbins: Pathologic Basis of Disease (Cotran, Kumar et al. 1999)

(a) In quieszenten, nicht proliferierenden Mausfibroblasten ist der Großteil der Cyclin-E/CDK2- und der Cyclin-A/CDK2-Komplexe mit p27 assoziiert, so dass deren Inhibition hier auf p27 zurückzuführen ist (Coats, Flanagan et al. 1996).

(b) Die Überexpression von p27 in Mäusefibroblasten führt zu deren Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Polyak, Lee et al. 1994; Toyoshima and Hunter 1994). Ein solcher Anstieg der p27-Konzentration wurde in unterschiedlichen G1-arretierten Zelltypen (Ratten-, Mausfibroblasten, Makrophagen, B-Lymphozyten) nachgewiesen (Kato, Matsuoka et al. 1994; Polyak, Lee et al. 1994; Poon, Toyoshima et al. 1995; Resnitzky and Reed 1995; Coats, Flanagan et al. 1996; Ezhevsky, Toyoshima et al. 1996).

(c) Die Reduktion der intrazellulären p27-Menge verhindert, dass Fibroblasten von Nagern quieszent werden und erhöht so den Proliferationsindex. Darüber hinaus zeigen diese Fibroblasten eine verkürzte G1-Phase (Coats, Flanagan et al. 1996; Rivard, L'Allemain et al. 1996). Ein solcher Phänotyp wird ansonsten bei Überexpression von G1-Cyclinen beobachtet und unterstreicht so die CDK-Inhibitorfunktion von p27 (Quelle, Ashmun et al. 1993; Resnitzky, Gossen et al. 1994; Ohtsubo, Theodoras et al. 1995; Resnitzky and Reed 1995). Die Konzentration der p27-Expression während der G1-Phase spielt eine kritische Rolle bei der Entscheidung zwischen Proliferation oder dem Übergang in die Ruhephase des Zellzyklus (Nichtteilungsphase, Quieszenz). Dies wurde durch die Analyse von p27-negativen Mäusen bestätigt. In zwei Studien wurde das p27-Gen vollständig deletiert und in einer weiteren Studie durch eine verkürzte p27-Mutante ohne CDK-Inhibitor-domäne ersetzt (Fero, Rivkin et al. 1996; Kiyokawa, Kineman et al. 1996; Nakayama, Ishida et al. 1996). Alle drei Mausstämme zeigten den gleichen Phänotyp, der durch eine gendosisabhängige Zunahme der Körpergröße, eine generelle Unfruchtbarkeit weiblicher Mäuse und Taubheit gekennzeichnet war. Letztere wurde durch die ungehemmte Proliferation der Haarzellen des Corti-Organs in adulten Mäusen verursacht (Chen and Segil 1999; Lowenheim, Furness et al. 1999). Offenbar ist durch das Fehlen von p27 bei einer Reihe von Zelltypen die Fähigkeit beeinträchtigt, während der Individualentwicklung (Ontogenese) aus dem Zellzyklus in die G0-Phase überzutreten (Vidal and Koff 2000).

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Mausfibroblasten ließen sich an embryonalen Stammzellen bestätigen. Die Stammzellen sind jedoch durch alternative Mechanismen der CDK-Regulation in der Lage, ein Fehlen von p27 zu kompensieren (Coats, Whyte et al. 1999)

Als negativer Regulator der CDK-Aktivität während der G1-Phase liegt es nahe anzunehmen, dass p27 eine Rolle als Tumorsuppressor spielt. Dies erschien jedoch

lange Zeit zweifelhaft, da homozygote inaktivierende Mutationen des p27-Gens selten gefunden wurden (Kawamata, Morosetti et al. 1995; Morosetti, Kawamata et al. 1995; Pietenpol, Bohlander et al. 1995; Spirin, Simpson et al. 1996). p27 ist daher kein Tumorsuppressor im klassischen Sinn (Knudson 1971). In humanen Tumoren werden jedoch häufig auffallend geringe Mengen an p27 detektiert, welche mit hoher histologischer Aggressivität und hoher Patientensterblichkeit korrelieren (Slingerland and Pagano 2000). Sowohl p27-negative als auch p27-heterozygote Mäuse, die mit γ -Strahlung oder chemischen Karzinogenen behandelt werden, zeigen im Vergleich zu identisch behandelten „normalen“ Mäusen eine erhöhte Rate an Tumoren. p27 wurde daher als „haplo-insufficient tumorsuppressor“ bezeichnet (Fero, Rivkin et al. 1996). Die beschriebenen Ergebnisse weisen auf die zentrale Bedeutung des p27-Levels im Rahmen der Karzinogenese hin.

Transkriptionelle Regulation der p27-Expression

Die intrazelluläre Menge an p27 kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Dieses spiegelt die Fähigkeit des Inhibitors wider, diverse mitogene und antiproliferative Signale in die Zellzykluskontrolle zu integrieren. Eine transkriptionelle Induktion von p27 wurde z.B. bei der Differenzierung von Monozyten/Makrophagen aus ihren Vorstufen (Liu, Lee et al. 1996; Inoue, Kamiyama et al. 1999) beobachtet. Eine weitere transkriptionelle Induktion von p27 zeigte sich in Fibroblasten, die als Antwort auf einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) in der G1-Phase arretieren (Gardner, Li et al. 2001).

Die Zellantwort auf mitogene Stimuli setzt eine strenge Regulation von p27 voraus, zu der unterschiedliche Mechanismen bzw. Faktoren beitragen (siehe Abbildung 15). Die Regulation von p27 wird z.B. durch das Tumorsuppressorgen PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN) vermittelt. Dieses Tumorsuppressorgen stellt eines der am häufigsten inaktivierten Gene bei verschiedenen Krebserkrankungen wie Hirntumoren, Brust-, Prostata-, Gebärmutter- und Hautkrebs dar (Simpson and Parsons 2001). Es führt zu einer erhöhten Expression von p27 (Li and Sun 1998; Gottschalk, Basila et al. 2001). PTEN erhöht die p27-Konzentration durch die Hemmung des Onkoproteins SKP2, welches eine wichtige Komponente der p27-Ubiquitinase darstellt (Mamillapalli, Gavrilova et al. 2001).

Des Weiteren wird die Transkription von p27 durch die sogenannten Forhead Transkriptionsfaktoren AFX, FKHR und FKHR-L1 (Medema, Kops et al. 2000) sowie durch das VHL (Von Hippel-Lindau)-Protein (Ivan and Kaelin 2001; Kondo and Kaelin 2001) induziert.

Neben der Positivregulation der p27-Aktivität wird diese durch verschiedene Signale negativ reguliert. Hierzu gehört beispielsweise die p27-Promotormethylierung, wie sie bei malignen Melanomen beobachtet wurde (Worm, Bartkova et al. 2000), ebenso wie die Regulation durch das Onkogen c-Myc (Vlach, Hennecke et al. 1996). C-Myc vermittelt die Sequestrierung von p27 durch die Induktion von Cyclin D1 und D2 (Bouchard, Thieke et al. 1999; Perez-Roger, Kim et al. 1999). Eine transkriptionelle Repression der p27-Genexpression durch das Onkogen C-Myc wurde in einer Studie von Yang im Jahre 2001 beschrieben (Yang, Shen et al. 2001).

Des Weiteren zeigte sich bei vielen Krebsformen wie Darm-, Brust-, Magen- und Lungenkrebs eine Überexpression von HER2 bei gleichzeitig verminderter Expression von p27 (Slamon, Godolphin et al. 1989; Slamon 1990). In einer anderen Studie wurde eine Korrelation zwischen verminderter p27-Expression und einer HER2-Überexpression bei primären Mammakarzinomen beschrieben (Newman, Xia et al. 2001).

Posttranskriptionelle Regulation von p27

Weiterhin führt HER2 zu einer verminderten Proteinstabilität von p27 und ist ebenso an der Verlagerung des p27-Proteins aus dem Nukleus in das Zytoplasma beteiligt. Die zytoplasmatische Lokalisation trägt scheinbar zusätzlich zur Proteindegradation bei (Yang, Zhou et al. 2000).

In glatten Gefäßmuskelzellen wird die p27-mRNA-Synthese im Fall der Zellstimulation durch den Wachstumsfaktor PDGF (platelet derived growth factor) vermindert induziert (Servant, Coulombe et al. 2000). In einigen untersuchten Szenarien gehen Veränderungen der p27-Menge jedoch nicht mit einer Veränderung der p27-mRNA-Konzentration einher (Hengst, Gopfert et al. 1998). Die regulierte Translation der p27-mRNA und der regulierte Abbau des p27-Proteins wurden als Mechanismen identifiziert, die der Oszillation von p27 während des Zellzyklus und seiner Akkumulation in quieszenten Zellen zugrunde liegen (Pagano, Tam et al. 1995; Agrawal, Hauser et al. 1996; Hengst and Reed 1996; Millard, Yan et al. 1997).

So findet im Gegensatz zu p21 ein Großteil der Regulation von p27 neben der transkriptionellen Regulation auch posttranskriptionell, im Rahmen des Ubiquitin-vermittelten Proteasom-Degradationssignalwegs (-mechanismus), statt (Pagano, Tam et al. 1995). Eine niedrige p27-Expression, die bei einer Reihe von unterschiedlichen Krebserkrankungen beobachtet wurde, ist möglicherweise die Folge eines verstärkten Ubiquitin-vermittelten p27-Abbaus. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass bei hochgradig malignen Colonkarzinomen im Vergleich zu Colonkarzinomen geringerer Malignität eine hohe Aktivität der p27-Abbaumechanismen vorliegt (Loda, Cukor et al. 1997).

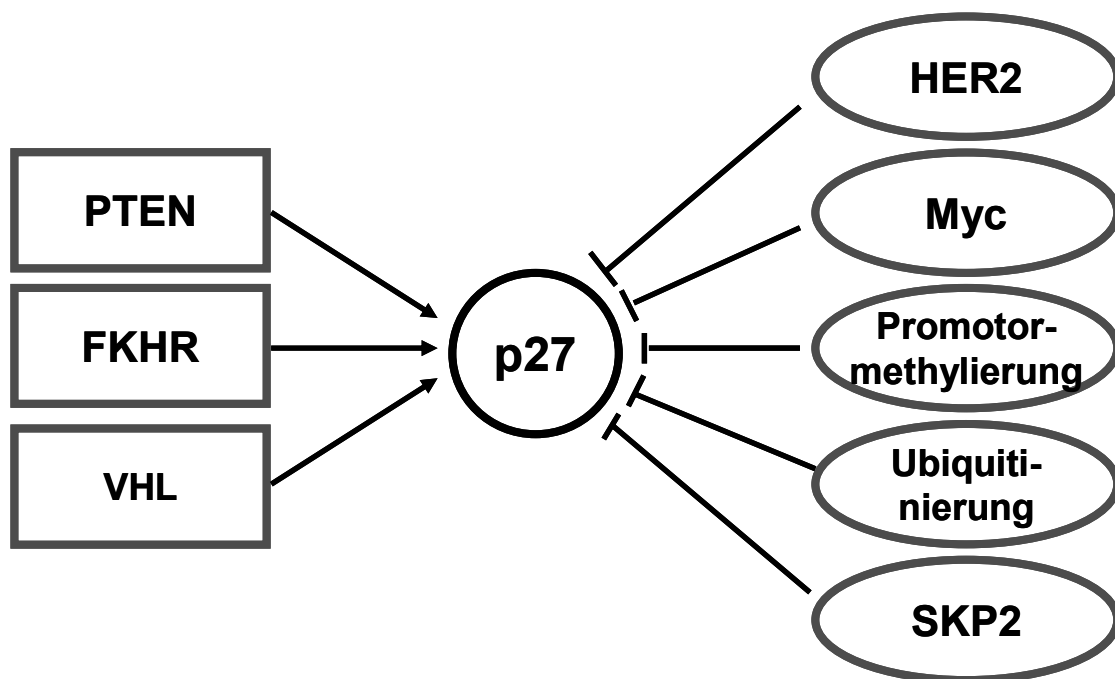


Abbildung 15 Mechanismen der Positiv- und Negativregulation der p27-Aktivität

p27 wurde im Rahmen der caninen Karzinogenese, insbesondere der Karzinogenese von Mammatumoren, bisher nur unzureichend untersucht. Es finden sich nur wenige Forschungsarbeiten, die diesen Themenkomplex behandeln. Die ersten Untersuchungen zu p27 im Rahmen caniner Krebserkrankungen finden sich im Zusammenhang mit caniner Stammzell-Leukämie (Huss, Theis et al. 1999). Im Jahr 2001 untersuchten SAKAI et al. immunhistochemisch das Expressionsprofil von p27 in caninen Hauttumoren unterschiedlicher Dignität (Sakai, Yamane et al. 2001). p27 wurde hier die Fähigkeit zugeschrieben, die Zellproliferation bei der Differenzierung von Zellen caniner Haut zu unterdrücken.

Des Weiteren konnte durch eine Studie an caninen Histiocyten und Mastzelltumoren immunhistologisch gezeigt werden, dass es in der Pathogenese dieser Art von Tumoren beim Hund zu einem frühzeitigen Verlust von p27 oder einem Ausbleiben der Expression des Proteins kommt (Wu, Hayashi et al. 2004).

Ziel dieser Arbeit und der Untersuchung caniner Mammatumoren ist es, die Expressionsprofile von p27 (und p21) zu untersuchen und somit unter anderem einen Beitrag zur phylogenetischen Vergleichbarkeit der einzelnen Spezies im Rahmen der Karzinogenese dieser Art von Tumoren zu leisten.