

# 5 Diskussion

## 5.1 Aufgabenstellung und Arbeitsplan

Humane Forschungsarbeiten belegen die Relevanz von Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren (CKIs), besonders p21 und p27 im Rahmen der Karzinogenese epithelialer Tumoren, insbesondere bei Mammatumoren des Menschen (Wu, Hayashi et al. 2004). Da dieses Thema in der veterinärmedizinischen Forschung bislang nur wenig untersucht wurde, war es Ziel dieser Arbeit, die Signifikanz der CKIs p21 und p27 auch im Rahmen der caninen Karzinogenese und eventuelle phylogenetische Phänomene zu überprüfen. Es war hierzu im Vorfeld der durchgeführten Experimente nötig, eine Auswahl an zu untersuchenden Kandidatengenen zu treffen. Daher wurden stichprobenartig Einzelproben caniner Mammatumoren (einfache, solide Adenokarzinome) im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe (NUM) des gleichen Individuums zunächst in einer Affymetrix-Chip-Analyse untersucht (siehe 3.10). Die Auswertung des Affymetrix-Chips zeigte unter anderem einen deutlichen Expressionsunterschied der Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren p21 und p27 in den caninen Mammatumoren im Vergleich zu NUM. Zur Validierung der Affymetrix-Chip-Analyse wird die real-time PCR als Methode der Wahl beschrieben (Dallas, Gottardo et al. 2005). Daher folgte der Affymetrix-Chip-Analyse die Untersuchung von 25 caninen Adenokarzinomen im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe des gleichen Individuums mittels real-time PCR (siehe 4.6.3). Um zusätzlich zu den Ergebnissen der p21- und p27-Expression auf mRNA-Ebene auch einen Einblick in die Expression der Kandidatengene auf Proteinebene zu erhalten, wurden Einzelproben immunhistochemisch auf p21 und p27 untersucht (siehe 4.7).

## 5.2 Versuchskritik

### 5.2.1 RNA-Stabilität

Da RNA starken Degradierungsprozessen unterliegt, sind verschiedene Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit RNA-haltigen Proben unabdingbar. Die

Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in ein RNA-Stabilisationsmedium (siehe 3.4.1 und 8.4.1) überführt und anschließend bei -80°C konserviert.

Durch die Zugabe eines Lysispuffers bei der Aufarbeitung der stabilisierten Proben innerhalb maximal einer Minute erfolgte zum einen die Lyse der zuvor homogenisierten Gewebeprobe, zum anderen wurde der RNA-Abbau durch enthaltene Guanidin-Isothiozyanat-Anteile verhindert. Die durch weitere Wasch- und Elutionsschritte isolierte RNA ist in Rnase-freiem Wasser bei -80°C lagerbar. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch zusätzlich darauf geachtet, dass direkt im Anschluss an die Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben die isolierte RNA in cDNA revers transkribiert wurde.

### **5.2.2 RNA-Qualitätskontrolle**

Zur Überprüfung von Menge und Reinheit der isolierten RNA wurde im Anschluss an die Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben eine photometrische Spektralanalyse durchgeführt. Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm) wurde der Reinheitsgrad der RNA bestimmt. Bei einem maximalen Extinktionswert der Wellenlänge von 260 nm konnten Verunreinigungen durch Proteine beziehungsweise organische Lösungsmittel ausgeschlossen werden. War dies nicht der Fall, wurde eine erneute RNA-Präparation vorgenommen.

Nach der photometrischen Spektralanalyse erfolgte eine weitere RNA-Qualitätskontrolle anhand der miniaturisierten Kapillarelektrophorese (Agilent 2100 bioanalyser) (siehe 3.4.3 und 3.4.4). Aus dem Elektropherogramm wurde softwaregestützt die RNA Integrity Number (RIN) ermittelt, welche die RNA-Qualität auf einer Skala von 1 bis 10 angibt. In der vorliegenden Arbeit wurden, in Anlehnung an aktuelle Forschungsarbeiten (Fleige and Pfaffl 2006), Proben mit RIN-Werten  $\geq 5$  in die Auswertung einbezogen. Die RIN der untersuchten RNA-Proben lag für p21 und p27 im Mittel bei 7,0. Proben mit einer RIN  $< 5$  wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Eine weitere RNA-Qualitätskontrolle war der enge Erwartungshorizont für die Expressionsrate des Referenzgens (siehe 5.2.3). Proben mit degradierter RNA zeigen verminderte Mengen an  $\beta$ -Aktin mRNA und wurden so anhand der qPCR-Ergebnisse aus dem Versuch ausgeschlossen.

### **5.2.3 Referenzgenen ( $\beta$ -Aktin)**

Referenzgene, die auch als House-Keeping-Gene bezeichnet werden, sind ubiquitär exprimiert und durch experimentelle Faktoren hinsichtlich ihrer Transkription nicht zu beeinflussen. Sie werden als Standards bei der relativen Quantifizierung verwendet (siehe 3.9.5). Da nicht zu erwarten ist, dass Gene existieren, die absolut unreguliert sind, birgt jede Wahl eines Referenzgens eine Fehlergefahr. Für die vorliegende Arbeit wurde  $\beta$ -Aktin als Referenzgen gewählt, da dieses wissenschaftlich anerkannt ist (Bustin 2000; Bustin 2002; Bustin and Nolan 2004). Des Weiteren gab es keine Hinweise auf versuchsbedingte Regulationen von  $\beta$ -Aktin.

## **5.3 Untersuchungen zu p21 und p27**

### **5.3.1 Zusammenfassung der Untersuchungen zu p21**

Durch die quantitative Analyse der 25 untersuchten Adenokarzinome mittels real-time PCR (qPCR) ließen sich die Daten der Affymetrix-Chip-Analyse nicht bestätigen. Die qPCR-Ergebnisse zeigten in Adenokarzinomen der caninen Mamma keinen signifikanten Expressionsunterschied für p21 im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Gewebe des gleichen Individuums. Es deutete sich lediglich die Tendenz einer erhöhten Expression an (siehe 5.3.3).

Im stichprobenartigen immunhistochemischen Nachweis von p21 zeigte sich bei den untersuchten Adenokarzinomen semiquantitativ eine deutlich erhöhte Proteinmenge an p21 im Vergleich zu den korrespondierenden nicht neoplastisch veränderten Mammagewebeprobe.

### **5.3.2 Zusammenfassung der Untersuchungen zu p27**

Auch für p27 ließen sich die Ergebnisse der Affymetrix-Chip-Analyse in der qPCR nicht bestätigen. Es konnte auch hier kein signifikanter Expressionsunterschied in den untersuchten Tumorseiten der caninen Mamma im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Gewebe des gleichen Individuums für p27 gezeigt werden. Hier allerdings zeigte sich die Tendenz zu einer verminderten Expression in den Adenokarzinomen im Vergleich zu neoplastisch unverändertem caninem Mammagewebe (siehe 5.3.3).

Die hierzu untersuchten Stichproben zeigten, immunhistologisch und semiquantitativ ausgewertet, eine deutlich verringerte p27-Proteinkonzentration in den Adenokarzinomen im Vergleich zum korrespondierenden nicht neoplastisch veränderten Mammagewebe.

### **5.3.3 Interpretation der Untersuchungen zu p21 und p27**

#### **5.3.3.1 Untersuchungen von Gewebehomogenaten**

Anhand der Untersuchungen des CKIs p21 auf RNA-Ebene ließ sich in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Expressionsunterschied in caninen Mammakarzinomen im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe des gleichen Individuums zeigen. Kritisch zu beurteilen ist hierbei die Verwendung von Tumorphomogenaten, sogenannten „Whole Mounts“, aufgrund der Varianz des histomorphologischen Profils dieser Proben. Neben den zu analysierenden epithelialen Zellen beeinflussen unter anderem auch Stroma, Gefäßzellen, intraepitheliale Lymphozyten, Myoepithelien die transkriptionellen Untersuchungen. Möglicherweise entsteht hierdurch ein selbstlimitierender Effekt eines Expressionsunterschiedes, der möglicherweise in „reinen“ Epithelzellen nachweisbar wäre. Zur weiteren Beurteilung wäre hier die Methode der Lasermikrodissektion die Methode der Wahl, welche die Möglichkeit der Analyse von einer ausgewählten, „reinen“ Zellpopulation bietet.

#### **5.3.3.2 Phylogenetische Unterschiede in caninen und humanen**

##### **Adenokarzinomen der Mamma**

Des Weiteren sind die phylogenetischen Unterschiede in der humanen und der caninen Karzinogenese als möglicher Grund für die unterschiedlichen Studienergebnisse zu bedenken. Durch weitere Validierung der hier ermittelten Ergebnisse sollte gezeigt werden, ob eine Übertragbarkeit von Studien am Hund auf den Menschen möglich ist. Die Unterschiede der Expressionsprofile in humanen Forschungsarbeiten im Vergleich zu Studien am Hund bezüglich p21 und p27 in Mammakarzinomen im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe weisen darauf hin, dass ein speziesübergreifender Modellcharakter in diesem Fall nicht gegeben ist.

### 5.3.3.3 Posttranskriptionelle Regulation von p21

Die vorliegenden Ergebnisse für die Expression von p21 in caninen Mammatumoren zeigen auf Transkriptionsebene keinen signifikanten Expressionsunterschied im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Gewebe der Mamma, semiquantitativ jedoch eine deutlich erhöhte Proteinmenge an p21 in der immunhistochemischen Untersuchung. p21 wird hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert. Eine mögliche Erklärung der hier vorliegenden Ergebnisse sind jedoch vor allem posttranskriptionelle Regulationsmechanismen wie z.B. eine Induktion der Translation bzw. eine verminderte Degradation und somit eine Akkumulation von p21. Da das p21-Protein ein sehr instabiles Protein darstellt (Maki and Howley 1997; Cayrol and Ducommun 1998; Rousseau, Cannella et al. 1999), wäre eine p21-Regulation durch Änderungen der Degradationsrate naheliegend.

#### p21-Degradation

Die p21-Degradation unterscheidet sich vom p27-Abbau darin, dass sie ebenfalls Proteasom-abhängig, jedoch Ubiquitin-unabhängig verläuft (Sheaff, Singer et al. 2000) (siehe 5.3.4.1). Die Inhibition des proteasomalen Systems bewirkt eine Verlängerung der Halbwertszeit des p21-Proteins und eine Akkumulation von p21<sup>Cip1</sup>-Ubiquitin-Konjugaten in der Zelle (Maki and Howley 1997; Cayrol and Ducommun 1998; Rousseau, Cannella et al. 1999; Sheaff, Singer et al. 2000). Der Abbau des p21-Proteins scheint aber Mutationsanalysen zufolge selbst nicht direkt einer Ubiquitinierung zu bedürfen (Voigt 2004). Demnach kann beim Vorliegen von Ubiquitin-Konjugaten und proteasomalem Abbau eines Proteins nicht zwangsläufig darauf geschlossen werden, dass die beobachtete Ubiquitinierung eine *Conditio sine qua non* für den proteasomalen Abbau des Proteins sei (Sheaff 2000).

p21 ist, wie auch p27, Substrat des SCF<sup>SKP2</sup>-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Dieser besteht aus dem F-Box-Protein SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) und dem dazugehörigen Protein CKS1 (cyclin kinase subunit 1) (Deshaies 1999; Tyers and Jorgensen 2000). Im Gegensatz zu p27 ist dieser Degradationsmechanismus für p21 als eine mögliche posttranskriptionelle Regulation unter zahlreichen anderen zu nennen (Bornstein, Bloom et al. 2003). So liefert die Inhibition der p21-Degradation durch den SCF<sup>SKP2</sup>-Ubiquitin-Ligase-Komplex eine mögliche Erklärung der Akkumulation des p21-Proteins bei unregulierter Expression der p21-mRNA.

## **5.3.4 Interpretation der Untersuchungen zu p27**

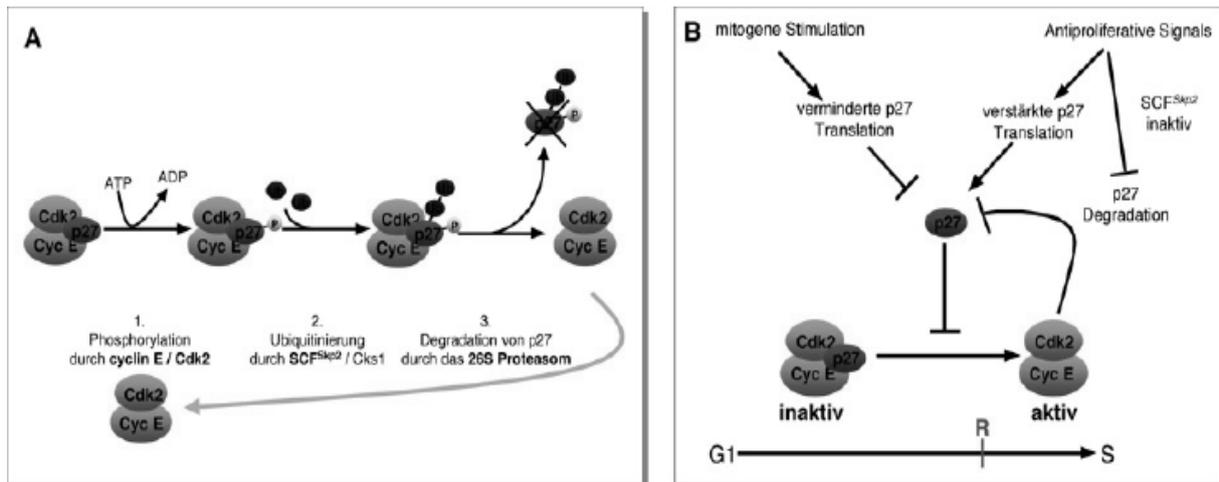
### **5.3.4.1 Posttranskriptionelle Regulation von p27**

Aus humanmedizinischen Forschungsarbeiten geht hervor, dass bei der Regulation der Expression des Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitors p27 neben transkriptionellen Regulationsmechanismen (Inoue, Kamiyama et al. 1999; Kolluri, Weiss et al. 1999; Medema, Kops et al. 2000; Shaffer, Yu et al. 2000) auch Regulationen auf Translationsebene (Agrawal, Hauser et al. 1996; Hengst and Reed 1996; Millard, Yan et al. 1997) und der Ubiquitin-vermittelte Abbau des Proteins von Bedeutung sind (Gopfert, Kullmann et al. 2003). Des Weiteren spielen posttranslationale Faktoren wie die Proteinstabilität, Komplexbildungen und die Lokalisation des Proteins eine wichtige Rolle in Bezug auf die p27-Expression.

In vielen Fällen konnte bei unveränderten p27-mRNA-Konzentrationen eine vermehrte bzw. auch reduzierte Expression des p27-Proteins gezeigt werden (Hengst and Reed 1998).

Laut GÖPFERT et al. (Göpfert, Kullmann et al. 2003) sind zwei posttranskriptionelle Mechanismen, die Translationskontrolle und die Regulation der Proteinstabilität, hauptverantwortlich für die Oszillation der p27-Proteinkonzentration im Verlauf des Zellzyklus und für die p27-Induktion in Zellen, die den Zellzyklus beenden und in den Ruhezustand (G0-Phase) übertreten (Pagano, Tam et al. 1995; Hengst and Reed 1996).

Die Proteinstabilität von p27 wird durch Proteasom-abhängige Degradation reguliert (Pagano, Tam et al. 1995; Harper 2001). Hierzu muss eine CDK2-vermittelte Phosphorylierung am Threonin 187 in p27 am G1/S-Phasenübergang stattfinden (Vlach, Hennecke et al. 1997; Ishida, Kitagawa et al. 2000; Sheaff, Singer et al. 2000; Connor, Kotchetkov et al. 2003). Des Weiteren findet eine Regulation durch mitogene und antiproliferative Signale während der G1-Phase und am G1/S-Phasenübergang statt (Hara, Kamura et al. 2001; Malek, Sundberg et al. 2001) (siehe Abbildung 37).



**Abbildung 37** **A.** p27 wird durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut: Phosphorylierung von Threonin 187 in p27 durch aktive Cyclin-E/CDK2-Komplexe initiiert die Ligation von Ubiquitin an p27. Ubiquitin-modifiziertes p27 wird durch das Proteasom abgebaut. **B.** Modell zur Regulation von p27 durch mitogene und antiproliferative Signale: Ein Feedback-Loop der Degradation von p27 wird dadurch gebildet, dass zur Degradation über die Ubiquitinligase SCF<sup>SKP2</sup> eine Phosphorylierung des Inhibitors durch aktive Cyclin-E/CDK2-Kinase notwendig ist. Die Degradation von p27 führt dazu, dass weiteres aktives Cyclin E/CKK2 entsteht. Dadurch wird verhindert, dass nach Aktivierung von Cyclin E/CDK2 p27 akkumulieren kann. Oberhalb des Feedback-Loops könnte – wie in diesem Modell spekuliert – die Regulation der Translation von p27 mitbestimmen, ob eine kleine Menge aktive Cyclin-E/CDK2-Kinase entsteht und damit der Feedback-Loop der p27-Degradation initiiert wird (Hengst 2003).

Die nicht signifikanten Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die beiden Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren möglicherweise einer post-transkriptionellen Regulation unterliegen. Die Hypothese einer Regulation von p21 und p27 auf Transkriptionsebene ließ sich in dieser Arbeit nicht bestätigen.

## 5.4 Abschließende Bewertung und Ausblicke

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit können als Grundstein für weitere Untersuchungen verstanden werden. Es konnte sowohl für p21 als auch im Falle von p27 gezeigt werden, dass auf Transkriptionsebene keine Regulation der Genexpression vorliegt. Weiterhin sollte den Untersuchungen der p21- und p27-Expressionen auf mRNA-Ebene eine Analyse der p21-/p27-Proteinexpression folgen. Die immunhistochemische Untersuchung (semiquantitativ) an Einzelproben deutete auf eine erhöhte Proteinexpression im Falle von p21 und eine verminderte p27-Proteinexpression bei unveränderter p21- und p27-Expression auf Transkriptionsebene hin. Die semiquantitative Aussage bezüglich der Proteinexpressionen von p21 und p27 in caninen Adenokarzinomen im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Gewebe der caninen Mamma könnte im Westernblot überprüft werden. Bei einer Bestätigung der immunhistochemischen Ergebnisse im Westernblot könnte die Untersuchung der posttranskriptionellen Regulationsmechanismen bezüglich p21 und p27 wie Regulationen auf Translationsebene und die Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation Thema weiterer Forschungsarbeiten sein. Auf diesem Weg würden möglicherweise phylogenetische Parallelen in humanen und caninen Adenokarzinomen der Mamma bezüglich der beiden CKIs aufgezeigt werden.

Des Weiteren sollten, besonders im Falle von heterogenem Gewebe wie z.B. Mammagewebe, den Untersuchungen von lasermikrodissezierten Proben Vorzug gegeben bzw. ein selbstlimitierender Effekt der Genexpression im Falle der Analyse von Gewebehomogenaten aus heterogenem Gewebe ausgeschlossen werden.

Außerdem sollten die vorliegenden Ergebnisse durch Untersuchungen einer größeren Probenanzahl erweitert und gegebenenfalls bestätigt werden.