

# 8 Anhang

## 8.1 Material

### 8.1.1 Tabellarische Darstellung des Probenmaterials

**Tabelle 7** Tabellarische Darstellung der untersuchten Mammatumoren. Es handelt sich um 14 einfache Karzinome (13 einfache Karzinome vom soliden Typ, 1 einfaches Karzinom vom tubulopapillären Typ) , 8 Komplexe Karzinome, 3 Karzinoma in situ

<b>Nr.</b>	<b>Tumor-ID</b>	<b>Hunderasse</b>	<b>Alter des Tieres</b>	<b>Diagnose</b>
1	5	Kurzhaarteckel	9	Komplexes Karzinom
2	8	Spitz-Mischling	14	Karzinoma in situ
3	9	West-Highland-White Terrier	11	Einfaches, solides Karzinom
4	13	Deutscher Schäferhund	13	Komplexes Karzinom
5	15	Briard	13	Komplexes Karzinom
6	16	Cocker-Spaniel	10	Karzinoma in situ
7	17A	Deutscher Schäferhund	8	Einfaches, solides Karzinom
8	17B	Deutscher Schäferhund	8	Karzinoma in situ
9	19	Schäferhund-Mischling	11	Einfaches, solides Karzinom
10	23	Mischling	11	Einfaches, solides Karzinom

<b>Nr.</b>	<b>Tumor-ID</b>	<b>Hunderasse</b>	<b>Alter des Tieres</b>	<b>Diagnose</b>
11	24	Teckel-Mischling	8	Einfaches, solides Karzinom
12	26	Terrier-Mischling	5	Komplexes Karzinom
13	29	Pudel	12	Einfaches, solides Karzinom
14	32	Cocker-Spaniel	8	Einfaches, solides Karzinom
15	45	Terrier-Mischling	8	Einfaches, tubulopapilläres Karzinom
16	47	Mischling	-	Einfaches, solides Karzinom
17	53	Pudel	8	Einfaches, solides Karzinom
18	54	West-Highland-White Terrier	-	Einfaches, solides Karzinom
19	55	Yorkshire-Terrier	9	Komplexes Karzinom
20	57	Schäferhund-Mischling	7	Einfaches, solides Karzinom
21	59A	Mischling	10	Einfaches, solides Karzinom
22	59B	Mischling	10	Komplexes Karzinom
23	60	Mischling	11	Einfaches, solides Karzinom
24	61	Labrador	7	Komplexes Karzinom
25	62	Pudel	8	Komplexes Karzinom

## 8.2. Histologische Untersuchung

### 8.2.1 Probenaufbereitung

#### 8.2.1.1 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

**Tabelle 8** Entparaffinierungsprotokoll

Substanz	Zeit	Wiederholungen
Xylol	5'	2
Ethanol (100%)	3'	3
Ethanol (96%)	3'	2
Ethanol (70%)	3'	1
H <sub>2</sub> O	5''	1

#### 8.2.1.2 Rehydratation in der aufsteigenden Alkoholreihe

**Tabelle 9** Aufsteigende Alkoholreihe

Substanz	Zeit	Wiederholungen
Ethanol (70%)	3'	1
Ethanol (96%)	3'	2
Ethanol (100%)	3'	3
Xylol	5'	2

#### 8.2.1.3 Färbeprotokoll der Hämatoxilin-Eosin-Färbung

**Tabelle 10** Färbeprotokoll der HE-Färbung

Substanz	Zeit
Mayers Hämalaun	3'
H <sub>2</sub> O	10'
Eosin	30''
Aqua dest.	5''

Herstellung der Mayers Hämalaun Lösung: 1g Hämatoxilin werden in 1000 ml H<sub>2</sub>O gelöst, 0,2 g Natriumiodat und 50g Aluminium-Kalium-Sulfat zugegeben und gelöst. Anschliessend wird 1g Citronensäure hinzugefügt.

#### **8.2.1.4 Verwendete Chemikalien**

Eosin (gelblich), Fa. Merck, Art.No. 1345

Ethanol reinst, 100 %, Fa. Merck, Art.No. 100986

Hämatoxilin (Monohydrat), Fa. Merck, Art.No.115938

Hämatoxilin (Solution), Fa. Sigma, Art.No. GHS-3

Hyper-Mount-Eindeckmedium, Fa. Thermo Shandon, Art.No. 9999120

Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecanhydrat), Fa. Merck, Art.No. 1010471000

Xylol 100%, Fa. Merck, Art.No. 86856025

Zitronensäure-Monohydrat, Fa. Merck, Art.No. 2440500

#### **8.2.2 Histologische Beurteilung**

##### **8.2.2.1 Verwendete Internetseiten**

AFIP :<http://www.afip.org/vetpath/who/whomamm.htm>

### **8.3 Immunhistochemie**

#### **8.3.1 Verwendete Antikörper**

p21 (C-19), Fa. Santa Cruz Biotechnology, Art.No. sc-397

p27/Kip1, Fa. BioGenex, Art.No. AM 396-5M

#### **8.3.2 Verwendete Chemikalien**

Super Sensitive Link-Label IHC Detection Kit, Fa. BioGenex, Art.No. QA900-9L

Fuchsin Substrate-Chromogen-System, Activating Agent, Buffered Substrate, Fa. DakoCytomation, Art.No. K0624

Levamisol, Dakocytomation, Art.No. X3021

3,3-Diaminobenzidin (DAB+, Liquid), Fa. DakoCytomation, Art.No. K3467: DAB Chromogen, Substrate Buffer



### 8.3.3 Herstellung der verwendeten Puffer

#### 8.3.3.1 Ansatz des Citratpuffers

**Tabelle 11** Herstellung des Citratpuffers

Substanz	Menge
Stammlösung A* (Merck, Art.No. 244)	9 ml
Stammlösung B* (Merck, Art.No 6448)	41 ml
Aqua dest.	400 ml

\*Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure (21,01 g  $C_6H_8O_7 \times H_2O$  in 1000 ml Aqua dest.

\*Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat (29,41 g  $C_6H_5O_7Na_3 \times 2 H_2O$  in 1000 ml Aqua dest.

#### 8.3.3.2 Ansatz des PBS-Puffers

**Tabelle 12** Herstellung des PBS-Puffers

Substanz
9,1 mM dibasisches Natriumphosphat
1,7 mM monophasisches Natriumphosphat
150 mM NaCl (Merck, Art.No. 106404)
NaOH zur pH-Wert-Einstellung auf 7,4

Herstellung von PBS (Phosphate buffered saline) für p21-Immunhistochemie

#### 8.3.3.3 Ansatz des TBS-Puffers

**Tabelle 13** Herstellung von TBS-Puffer

Substanz
50 mM Tris (Merck, Art.No. 108382), pH 8
150 mM NaCl (Merck, Art.No. 106404)

Herstellung von TBS (Tris buffered saline) für p27-Immunhistochemie

## 8.3.4 Herstellung der Färbesubstrate

### 8.3.4.1 Ansatz des DAB (3,3-diamino-Benzidin)-Substrats

**Tabelle 14** Herstellung des DAB-Substrats

Substanz	Menge
DAB-Chromogen	2 Tropfen
(DAB-) Substratpuffer	2,5 ml
Wassersoffperoxid	1 Tropfen

### 8.3.4.2 Ansatz des Neufuchsin-Substrats

**Tabelle 15** Herstellung des Neufuchsin-Substrats

Substanz	Menge
Neufuchsin Chromogen	50 µl (1 Tropfen)
Neufuchsin Aktivator	50 µl (1 Tropfen)
	1 Minute vermischen
Levamisol	1 Tropfen

## 8.4 Isolierung der Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe

### 8.4.1 Stabilisierung der Proben-RNA

#### 8.4.1.1 Verwendete Chemikalien

RNAlater RNA Stabilization Reagent (50ml), Fa. Qiagen, Art.No. 76104

### 8.4.2 Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben

#### 8.4.2.1 Verwendete Chemikalien

„NucleoSpin RNA II“-Kit, Fa. Macherey-Nagel, Art.No. 740955250: Buffer RA1, Buffer RA2, Buffer RA3, Buffer MDB, DNase reaction buffer, DNase I, H<sub>2</sub>O (RNase free), NucleoSpin Filter units, NucleoSpin RNA II columns, NucleoSpin collecting tubes, 1,5 ml microcentrifuge tubes

demineralisiertes Wasser = aqua purificata, Fa. Roth, Art.No. 4227.1

Ethanol, Roth, Art.No. 5054.3

β-Mecaptoethanol: 2-Mercaptoethanol, Fa. Roth, Art.No. 4227.1

#### **8.4.2.2 Verwendete Utensilien**

Schwingmühle MM 200, Fa. Retsch, Art.No. 207380001

Adapter für 5 Reaktionsgefäße, Fa. Retsch, Art.No. 220080005

Stainless Steel Beads (5 mm), Fa. Qiagen, Art.No. 69989

Kühlzentrifuge 5804 R, Fa. Eppendorf, Art.No. 5805 000.017

Mikrozentrifuge 5415 D, Fa. Eppendorf, Art.No. 5425 000.219

1,5 ml-Röhrchen: Multi-Reaktionsgefäße, Fa. Roth, Art.No. 7080.1

#### **8.4.3 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes**

##### **8.4.3.1 Verwendete Utensilien**

Photometer: Biophotometer, Fa. Eppendorf

Uvetten, 220-1600 nm, Fa. Eppendorf, Order no. 0030106.300

#### **8.4.4 RNA-Qualitätskontrolle**

##### **8.4.4.1 Verwendete Chemikalien**

RNA 6000 Nano LabChip, Fa. Agilent Technologies, Art.No. 5065-4476: reagents (RNA 6000 Nano gel matrix, RNA 6000 Nano dye concentrate, RNA 6000 Nano Marker), supplies, 25 chips, 2 cleaning chips, 1 syringe, reaction kit guide

Ambion RNA Ladder, Fa. Ambion, Art.No. 7152

##### **8.4.4.2 Verwendete Utensilien**

Agilent 2100 Bioanalyser Desktop System, Fa. Agilent Technologies, Art.No. G2940CA: 2100 bioanalyser complete with HP/Compaq desktop PC, printer, 2100 expert software, vortex mixer

2100 Bioanalyser Electrophoresis Set, Fa. Agilent Technologies, Art.No. G2947CA

Thermomixer compact, Fa. Eppendorf

## 8.4.5 Reverse Transkription

### 8.4.5.1 Reaktionsansatz und Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription

**Tabelle 16** Ansatz: RT-Probenmix

Substanz	Menge ( $\mu\text{l}$ )
Template	x (1 $\mu\text{g}$ )
Oligo-dt-Primer	1
RNase freies Wasser	x (ad 10,5 $\mu\text{l}$ )

**Tabelle 17** Ansatz RT-Mix

Substanz	Menge ( $\mu\text{l}$ )
5x RT-Puffer	4
DTT, 0,1 M Dithiothreitol	2
dNTPs (2 mM), Desoxyribonukleosidtriphosphat	2
RNasin, RNase-Inhibitor, 40 U/ml	0,5
Reverse Transkriptase	1

### 8.4.5.2 Verwendete Chemikalien

Oligo dt Primer, Fa. Promega, Art.No. C110A

RT-Puffer, 5-fach konzentriert, Fa. Roche, Art.No. 1785842

DTT (Dithiothreitol), Fa. MBI Fermentas, Art.No. R0861

dNTP-Mix (2 mM), Fa. MBI Fermentas, Art.No. R0241

Rnasin Rnase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ ), Fa. Promega, Art.No. N211B

Expand Reverse Transcriptase (50 U/ $\mu\text{l}$ ), Fa. Roche, Art.No. 1785834

## 8.5 Konventionelle PCR

### 8.5.1 Reaktionsansatz und Reaktionsprotokoll der konventionellen PCR

**Tabelle 18** Reaktionsansatz: Konventionelle PCR

Substanz	Menge (µl)
10x PCR Reaction Buffer	5
Q-Solution	10
dNTPs (2 mM)	5
Primer sense (20 µM) (Sequenz siehe)	1
Primer antisense (20µM) (Sequenz siehe)	1
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,3
Aqua bidest.	ad 50 µl

**Tabelle 19** Reaktionsprotokoll der Konventionellen PCR

Zyklus	Zyklusphase	Wiederholungen	Zeit (Minuten)	Temperatur (°C)
1	Denaturierung	1	3	95
2	Denaturierung	30-40	1	94
	Annealing	30-40	1	50 (p21), 58,7 (p27)
	Elongation	30-40	1,5	72
3	Finale Elongation	1	10	72
4	Kühlen	1		4

#### 8.5.1.1 Verwendete Chemikalien

PCR Puffer 10x, Fa. Qiagen, Art.No. 1005479

Q-Solution 5x, Fa. Qiagen, Art.No. 1005485

dNTP-Mix (2 mM), Fa. MBI Fermentas, Art.No. R0241

Primer (s. Anhang), Fa. MWG Biotech

Taq DNA Polymerase (250 U), Fa. Qiagen, Art.No. 201203

#### 8.5.1.2 Verwendete Utensilien

Thermocycler, Fa.Biometra

## **8.5.2 Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide**

### **8.5.2.1 Verwendete Internetseiten**

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Ensembl: <http://www.ensembl.org/>

### **8.5.2.2 Primerhersteller**

Fa. MWG Biotech; Ebersberg: <http://www.mwg-biotech.com/html/all/index/php>

## **8.5.3 DNA-Gelelektrophorese**

### **8.5.3.1 Verwendete Chemikalien**

1,3 %-iges Agarosegel: Agarose, Fa. Invitrogen

TAE-Puffer, pH 8,0 (0,04 M Tris-HCl (Fa. Serva), 0,001 M EDTA (Fa. Serva) in Wasser)

DNA-Ladder (100 bp), Fa. Promega

Ethidiumbromid-Färbung: Ethidiumbromidlösung, Fa. Serva

5x Probenpuffer (Bromphenol Blue 0,25% (w/v); Ficoll 1,077 15% (v/v), Fa. Biochrom)

Laufpuffer (2000ml TAE, 80 µl Ethidiumbromid (10mg/ml)

Loading Dye Solution, Fa. MBI Fermentas

### **8.5.3.2 Verwendete Utensilien**

Power Supply: BIO-RAD, POWER PAC 200

UV-Transluminator FLX-20M, Fa. Biometra

## **8.5.4 Präparative Gelelektrophorese und Extraktion einer DNA-Bande**

### **8.5.4.1 Verwendete Chemikalien**

„QIAquick Gel Extraction Kit“, Fa. Qiagen, Art.No. 28704: Puffer QG, „QIAquick-spin-column“, 2 ml Sammelröhrchen, Puffer PE, Puffer EB

Aqua purificata, Fa. Roth, Art.No. T143.3

Isopropanol: 2-Propanol, Fa. Roth, Art.No. 6752.3

### **8.5.4.2 Verwendete Utensilien**

UV-Transluminator FLX-20M, Fa. Biometra

## 8.6 Klonierung von Plasmiden

### 8.6.1 Ligation

#### 8.6.1.1 Verwendete Chemikalien

T4 DNA Ligase, Fa. Invitrogen, Art.No. 15224017

T4 DNA Ligase Buffer, Fa. Invitrogen, Art.No. 46300018

#### 8.6.1.2 Klonierungsvektor

pGEM-T Easy Vektor, Fa. Promega

### 8.6.2 Präparation kompetenter E. coli

#### 8.6.2.1 Verwendete Bakterienstämme

E.coli Top10, Top 10FÇ und LMG 194

#### 8.6.2.2 Verwendete Chemikalien

CaCl<sub>2</sub> (1 M Stammlösung, sterilfiltriert)

##### 8.6.2.2.1 Herstellung des LB-Mediums (pH 7,8)

**Tabelle 20** Ansatz des LB-Mediums

Substanz	Menge (g)
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	10
Aqua bidest.	ad 1l

#### 8.6.2.3 Verwendete Utensilien

Minifuge 2, Fa. Heraeus

## 8.6.3 Transformation

### 8.6.3.1 Chemikalien zur Herstellung verwendeter Puffer und Agarplatten

Ampicillin (20mg/ml Stammlösung, sterilfiltriert), Fa. Sigma

LB-Agarplatten (200 ml LB-Medium (siehe 0) + 3g Agar noble)

#### 8.6.3.1.1 Herstellung von LB-Agar

**Tabelle 21** Ansatz des LB-Agars

Substanz	Menge
Ampicillin	100 mg/l
X-gal	20 g/l
IPTG	240 mg/l

#### 8.6.3.1.2 Herstellung des NZY-Mediums

**Tabelle 22** Ansatz des NZY-Mediums

Substanz	Menge (g)
NZ amine	10
Hefeextrakt	5
NaCl	5
Aqua bidest.	ad 1l

Herstellung von NZY-Medium mit pH 7,5: Die Medienbestandteile wurden in Aqua bidest. gelöst, der pH wurde mit 1 M NaOH eingestellt, und die Lösung wurde auf 1 l aufgefüllt. Das Medium wurde autoklaviert, und nachdem es auf 60°C abgekühlt war, wurden 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>-, 12,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>- und 10 ml 2 M Glucose als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben.

#### 8.6.3.2 Verwendete Utensilien

Thermoschüttler, Fa. B. Braun



## 8.6.4 Präparation von Plasmid-DNA

### 8.6.4.1 Verwendete Chemikalien

NucleoSpin Plasmid Kit, Fa. Macherey-Nagel, Art.No. 740588: Puffer A1, Puffer A2, Puffer A3, Puffer AW, Puffer A4, Puffer AE, Rnase A, NucleoSpin Plasmid columns, NucleoSpin collecting tubes

### 8.6.4.2 Verwendete Utensilien

Sterile Zahnstocher

CO<sub>2</sub> - Feuchtbrutschrank, Fa. Heraeus

## 8.6.5 Restriktionsenzymverdau

### 8.6.5.1 Ansatz für den Restriktionsenzymverdau

**Tabelle 23** Ansatz Restriktionsenzymverdau (25µl)

Substanz	Menge (µl)
DNA	10
10x Puffer	2,5
Enzym	1
Aqua bidest.	ad 25 µl

### 8.6.5.2 Verwendete Chemikalien

Restriktionsenzym: EcoR1, EcoR1-Puffer (10-fach), Fa. New England BioLabs, USA

Aqua purificata, Fa. Roth, Art.No. T143.3

Glycerin, Fa. Roth, Art.No. 7530.1

### 8.6.5.3 Verwendete Utensilien

Mini-Tube: PCR Softtubes, 0,2 ml, Art.No. 711000, Art.No. 711080, Fa. Biozym

CO<sub>2</sub> - Feuchtbrutschrank, Fa. Heraeus

## 8.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durchgeführt von: Sequence Laboratories Göttingen GmbH <http://www.SEQLAB.de>

## 8.8 Quantitative PCR

### 8.8.1 Reverse Transkription

#### 8.8.1.1 Verwendete Chemikalien

„iScript-cDNA-Synthese-Kit“, Fa. Bio-Rad: “5x iScript Reaction Mix”, “iScript reverse Transkriptase”, Nuclease freies Wasser

#### 8.8.1.1.1 Reaktionsansatz und Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription

**Tabelle 24** Reaktionsansatz: RT

Substanz	Menge (µl)
5x iScript Reaction Mix	4
iScript reverse Transkriptase	1
Nuclease freies Wasser	14
RNA Probe (100ng/µl)	1

**Tabelle 25** Reaktionsprotokoll der RT

Zyklus	Zeit (Minuten)	Temperatur (°C)
1	5	25
2	30	42
3	5	85
4	∞	4

#### 8.8.1.2 Verwendete Utensilien

Thermocycler: Techne Cyclone 25, Fa. PeQLab Biotechnologie GmbH

Mini-Tube: PCR Softtubes, 0,2 ml, Art.No. 711000, Art.No. 711080, Fa. Biozym

## 8.8.2 Protokoll der quantitativen PCR

### 8.8.2.1 Verwendete Chemikalien

qPCR KIT: „iQ SYBR Green Supermix, Fa: Biorad, Cat.No. 170-8884

Aqua purificata, Fa. Roth, Art.No. T143.3

### 8.8.2.2 Reaktionsansatz und Reaktionsprotokoll der qPCR

**Tabelle 26** Reaktionsansatz: qPCR

Substanz	Menge
Primer sense	0,5µl
Primer antisense	0,5µl
Aqua purificata	6,5µl
Master Mix	12,5µl
Template cDNA	5µl

**Tabelle 27** Reaktionsprotokoll: qPCR

Zyklus	Zyklusphase	Wiederholungen	Schritt	Prozess	Zeit (Min)	Temperatur (°C)
1	Denaturierung	1	1		12	95
2	Amplifikation	35	1	Denaturierung	0,5	95
			2	Annealing/Elongation	2	*
3		1	1		0,5	95
4		1	1		0,5	55
5		80	1	Schmelzkurve	0,2	55-95

### 8.8.2.3 Verwendete Utensilien

qPCR-Platte 96-well, Fa. ABgene, AB-00600

MyiQ Cycler, Fa. Biorad, Cat.No. 170-9740

## 8.8.3 Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die qPCR

### 8.8.3.1 Verwendete Internetseiten

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Primer3: [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Ensembl: <http://ensembl.org>

### 8.8.3.2 Primerhersteller

Fa. MWG Biotech; Ebersberg: <http://www.mwg-biotech.com/html/all/index/php>

## 8.9 Weitere verwendete Utensilien und Geräte

Sterilwerkbank 1: captair<sup>R</sup>bio, Fa. Erlab, Sterilwerkbank 2: IGN Gelaire, ICN Biomedicals,

HF A48

Vortex: REAX top, Fa. Heidolph

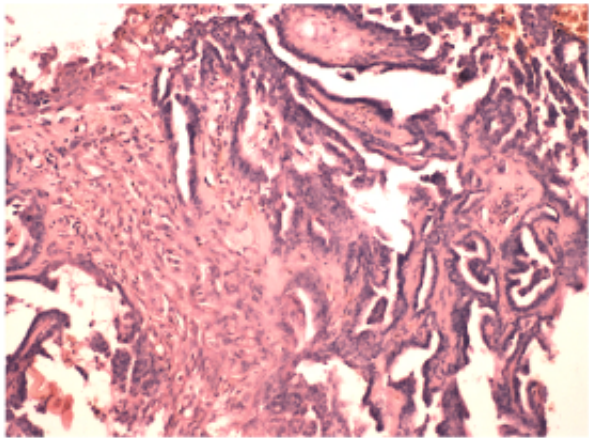
Zentrifugen: centrifuge 5415D, Fa. Eppendorf; e5804R, Fa. Eppendorf

## 8.10 Sequenzen verwendeter Primer

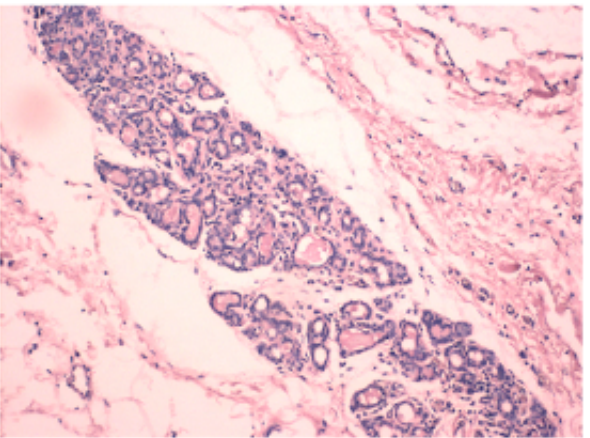
**Tabelle 28** Tabellarische Darstellung der verwendeten Primer (RT-PCR und qPCR)

<b>p21</b>	
kPCR forward	p21 95-113: 5'-GCGACTGTGATGCGCTAAT-3' (sense)
kPCR reverse	p21 475-494: 5'-TAGGGCTTCCTCTTGGAGAA-3' (antisense)
qPCR forward	p21 canine 312-331: 5'-ACCTCTCAGGGCCGAAAAC-3' (sense)
qPCR reverse	p21 canine 380-400: 5'-TAGGGCTTCCTCTTGGAGAA-3' (antisense)
<b>p27</b>	
kPCR forward	p27 1-20: 5'-ATGTCAAACGTGCGAGTGTC-3' (sense)
kPCR reverse	p27 565-584: 5'-CTTCTGAGGCCAGGCTTCTT-3' (antisense)
qPCR forward	p27 canine 436-454: 5'-GCACTGGGATCAGGAAGC-3' (sense)
qPCR reverse	p27 canine 484-506: 5'-TTCTGTTCTGTTGGCTCTTTTG- 3' (antisense)
<b>β-Aktin</b>	
kPCR forward	β-Aktin 488-507: 5'-3'(sense)
kPCR reverse	β-Aktin 1033-1049: 5'-GAC AGC GAG GCC AGG AT-3' (antisense)
qPCR forward	β-Aktin 549-568: 5'-CGACCTGACCGACTACCTCA- 3'(sense)
qPCR reverse	β-Aktin 620-639: 5'-TTTGATGTCACGCACGATTT- 3' (antisense)

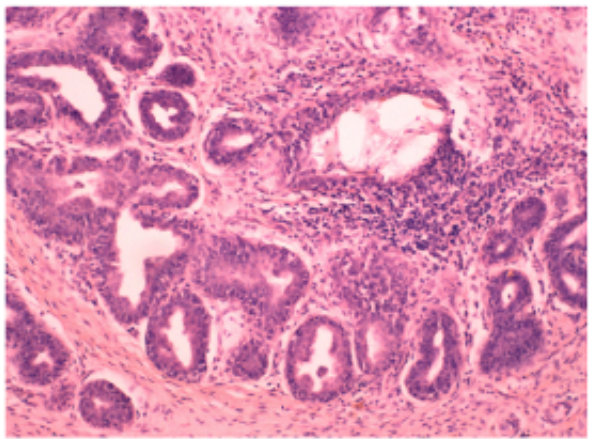
**8.11 Darstellung der untersuchten Mammatumoren und des korrespondierenden unveränderten Mammagewebes des gleichen Individuums (HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung)**



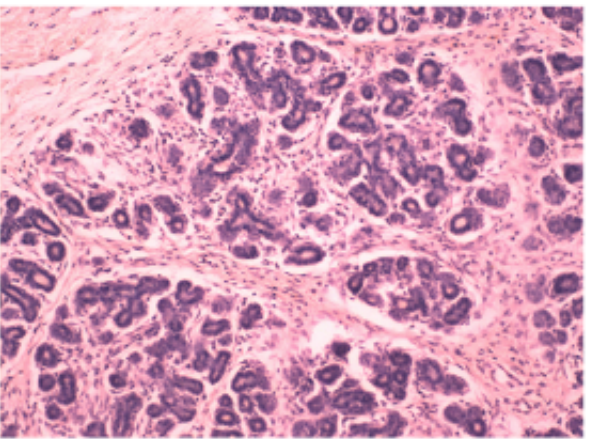
5 A: Komplexes Karzinom



5 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

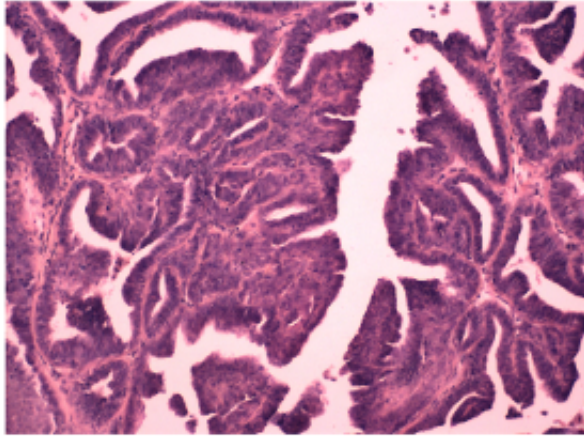


8 A: Karzinoma in situ

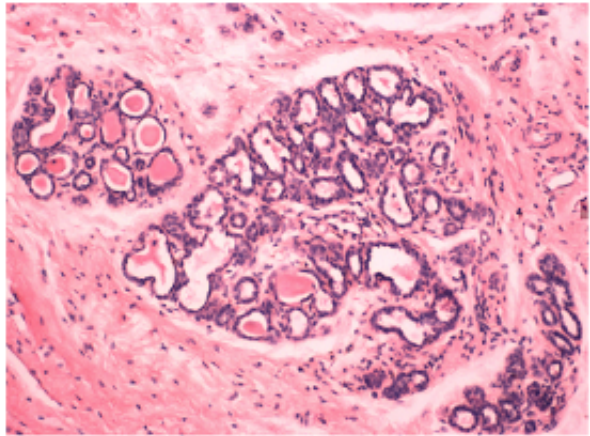


8 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

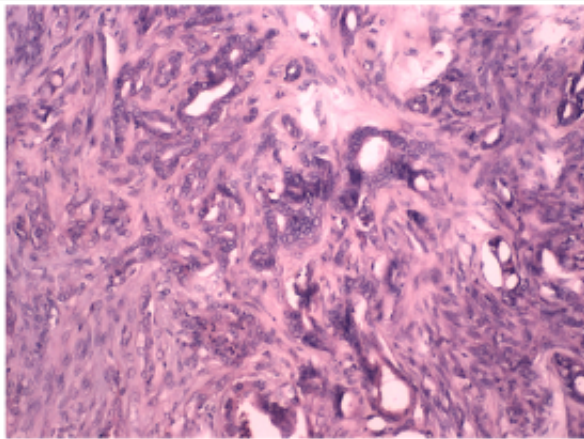




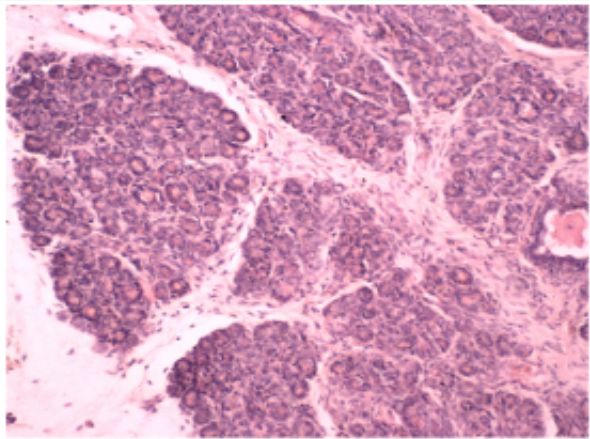
9 A: Einfaches, solides Karzinom



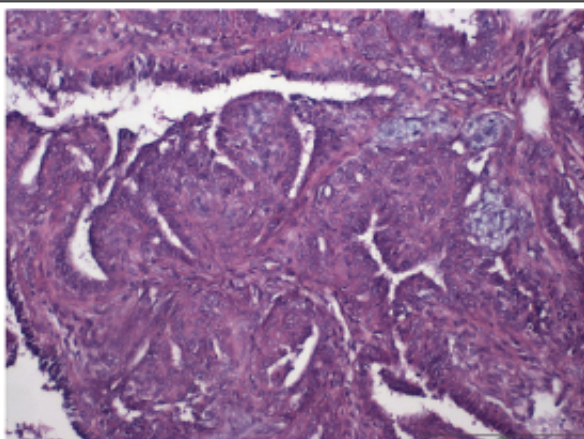
9 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe



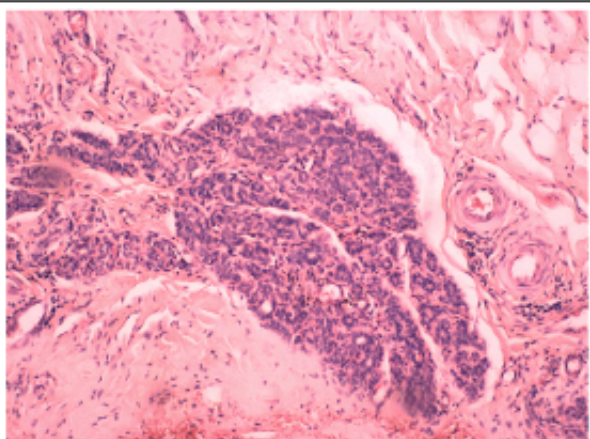
13 A: Komplexes Karzinom



13 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

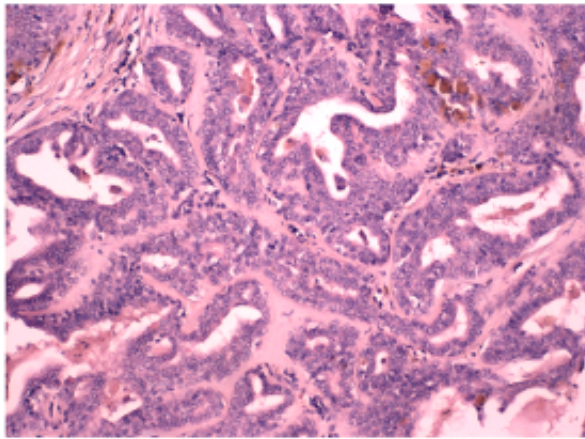


15 A: Einfaches, solides Karzinom

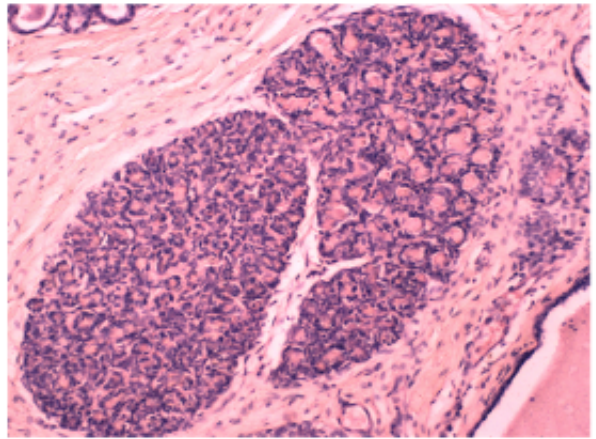


15 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

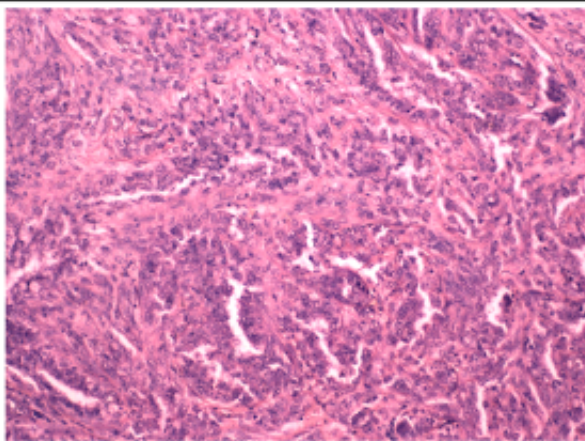




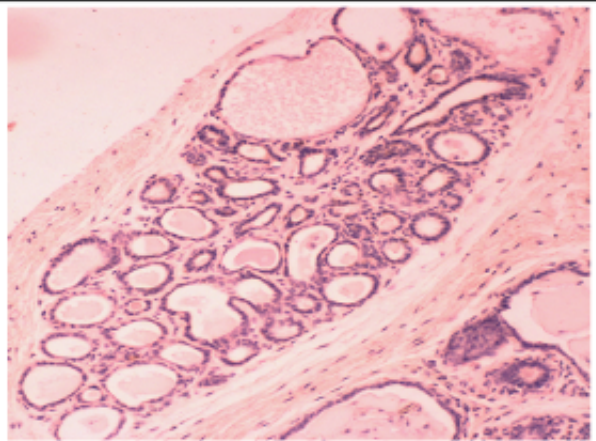
16 A: Karzinoma in situ



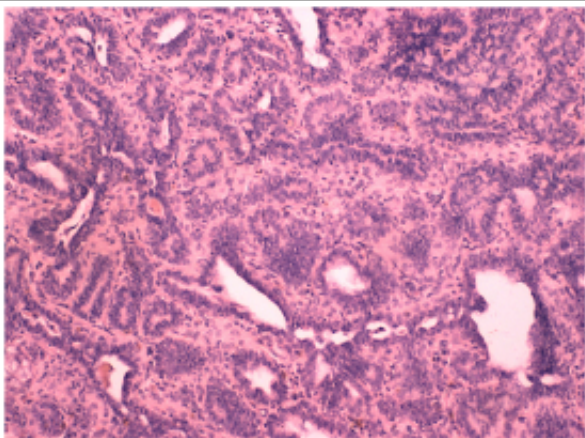
16 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe



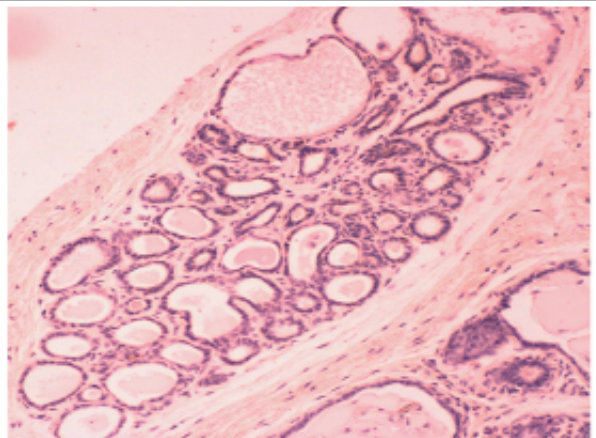
17 A: Einfaches, solides Karzinom



17 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

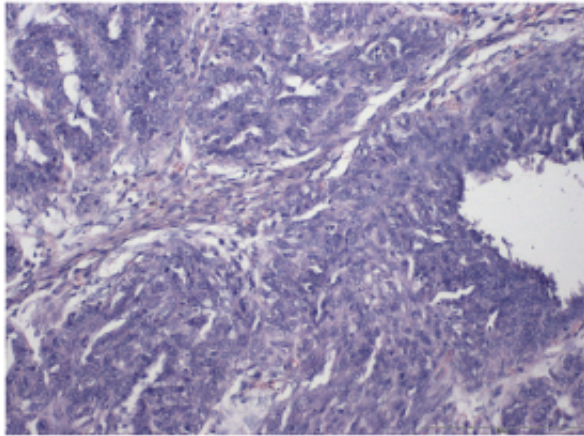


17 B: Karzinoma in situ

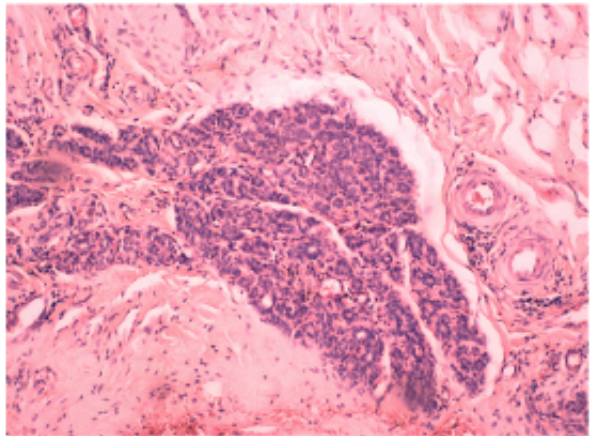


17 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

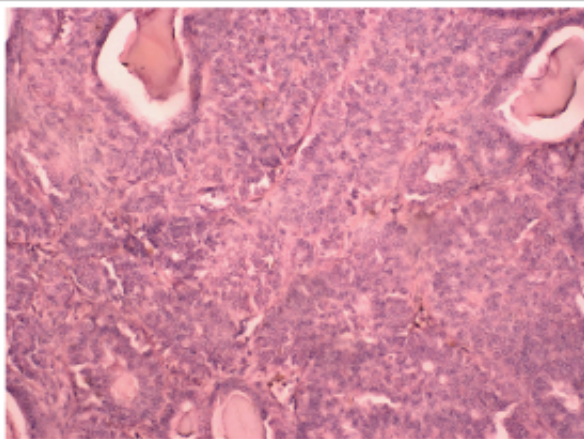




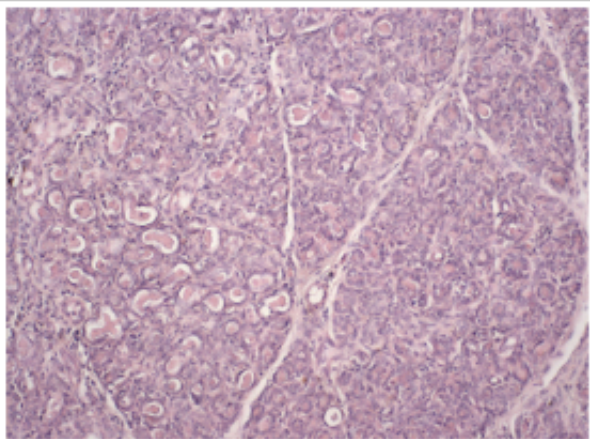
19 A: Einfaches, solides Karzinom



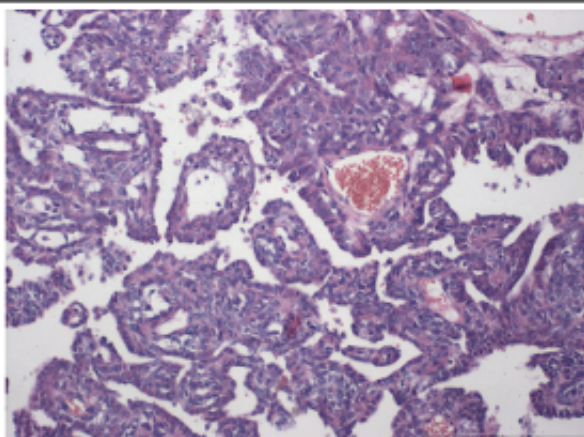
19 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe



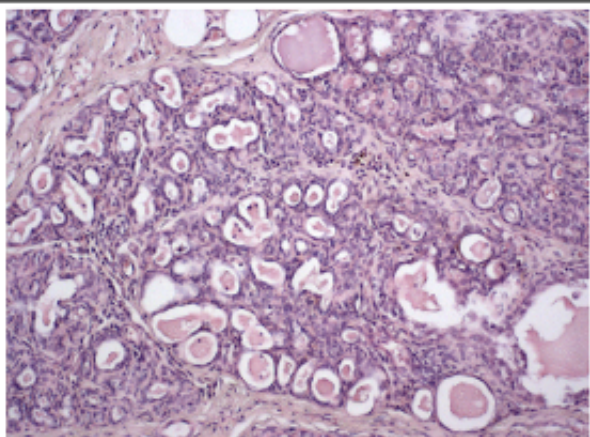
23 A: Einfaches, solides Karzinom



23 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

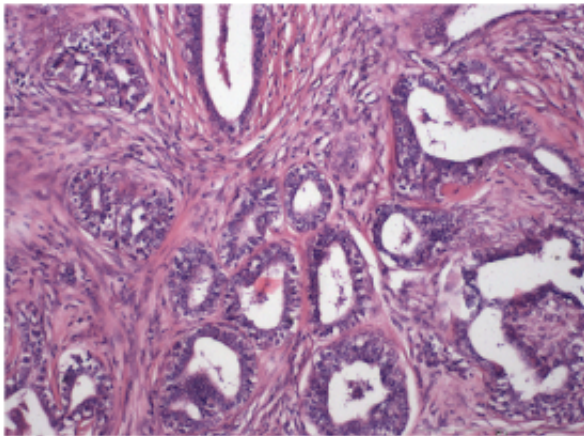


24 A: Einfaches, solides Karzinom

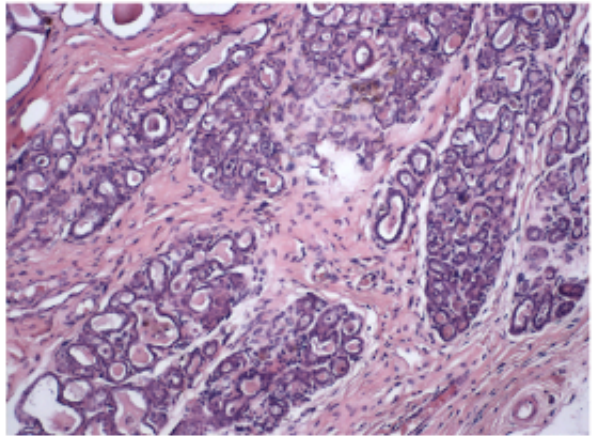


24 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

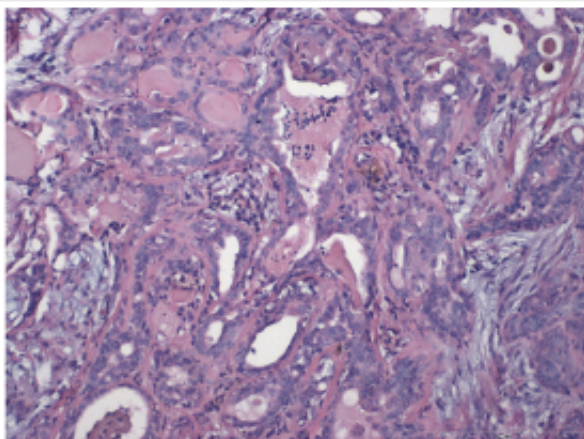




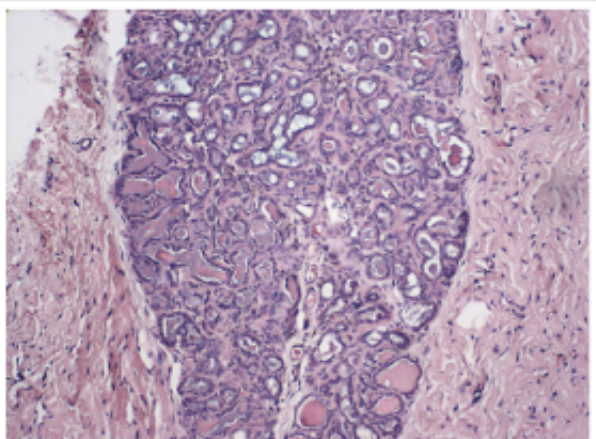
26 A: Komplexes Karzinom



26 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

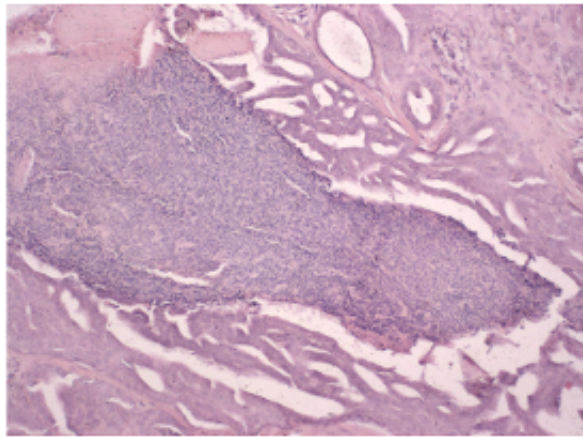


29 A: Einfaches, tubulopapilläres Karzinom

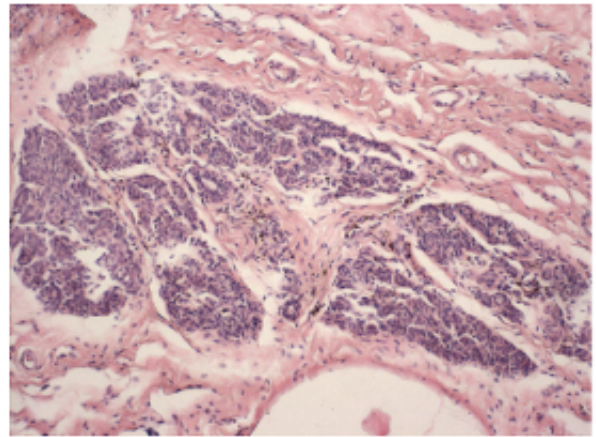


29 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

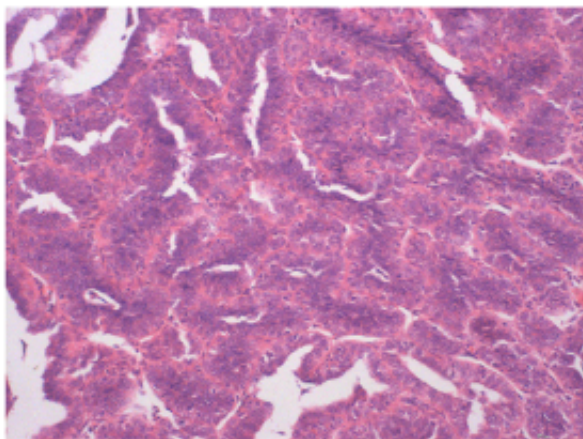




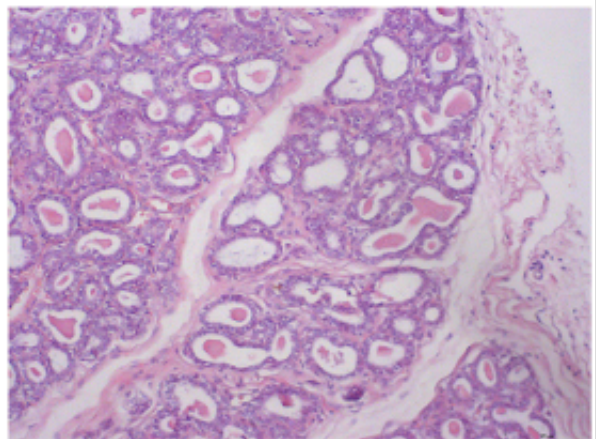
32 A: Einfaches, solides Karzinom



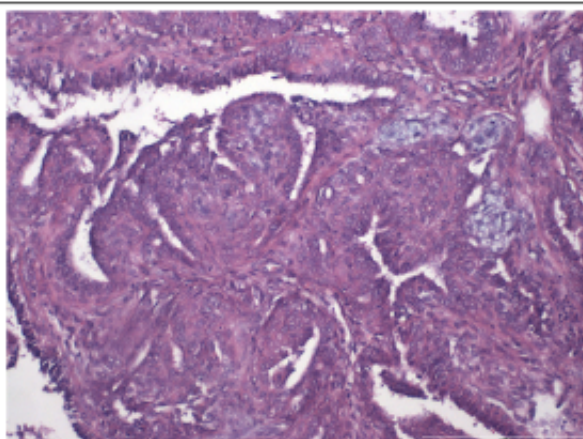
32 N: Morphologisch unverändertes Mammagewebe



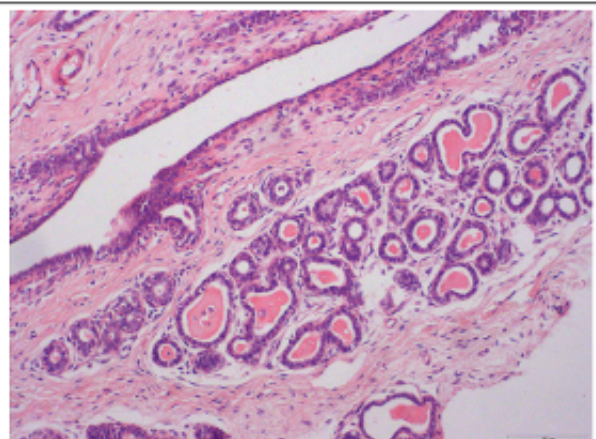
45 A: Einfaches, tubulopapilläres Karzinom



45N: Morphologisch unverändertes Mammagewebe

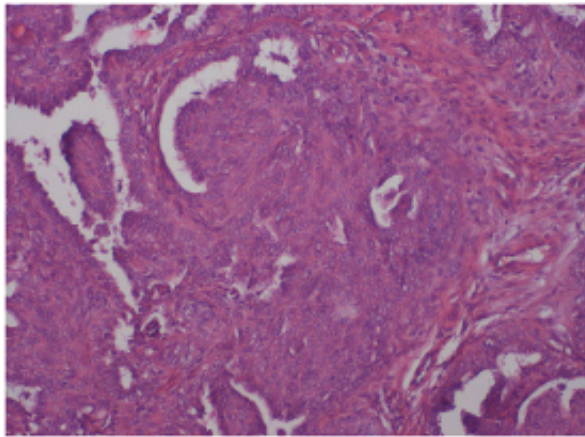


47 A: Einfaches, solides Karzinom

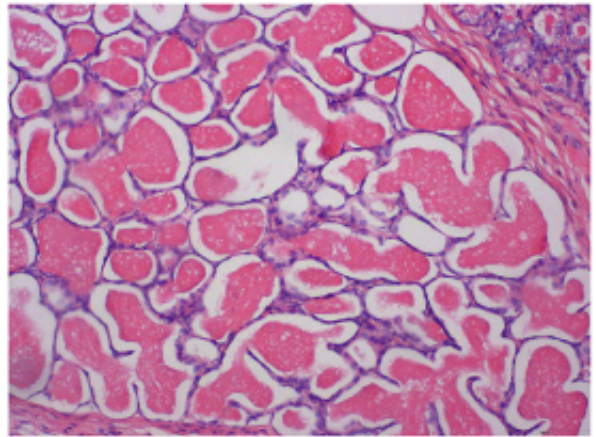


47 N: Morphologisch unverändertes Mammagewebe

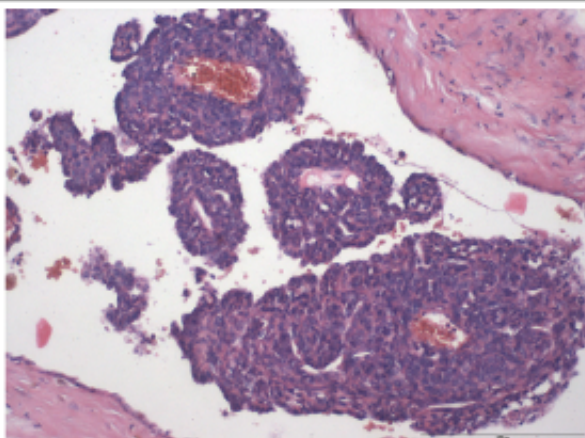




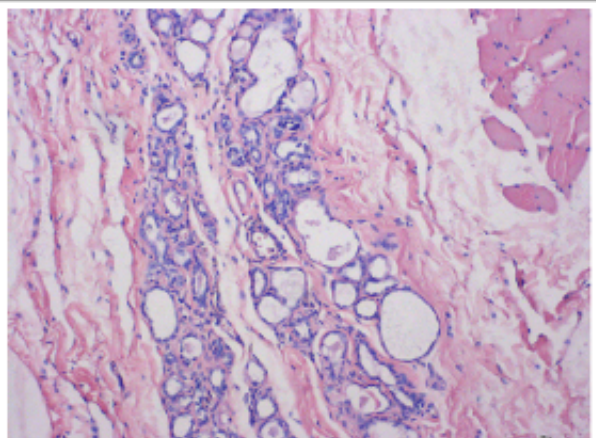
53 A: Einfaches, solides Karzinom



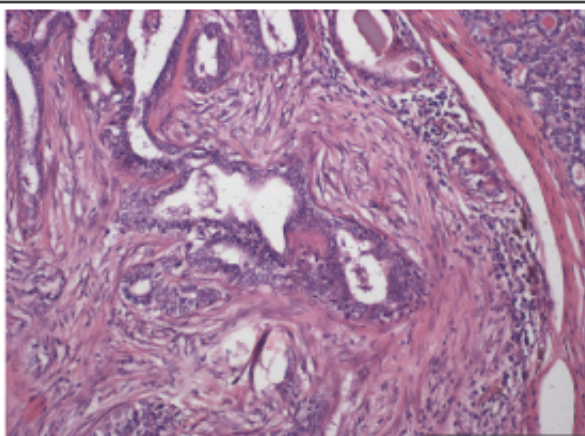
53 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe



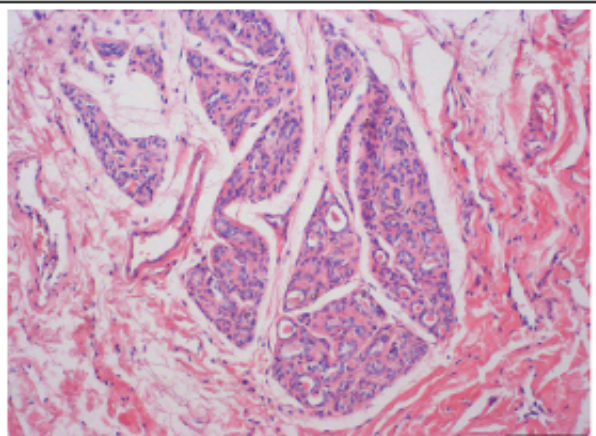
54 A: Einfaches, solides Karzinom



54 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

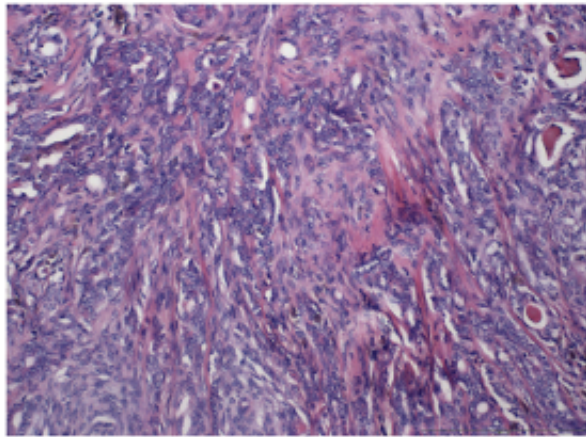


55 A: Komplexes Karzinom

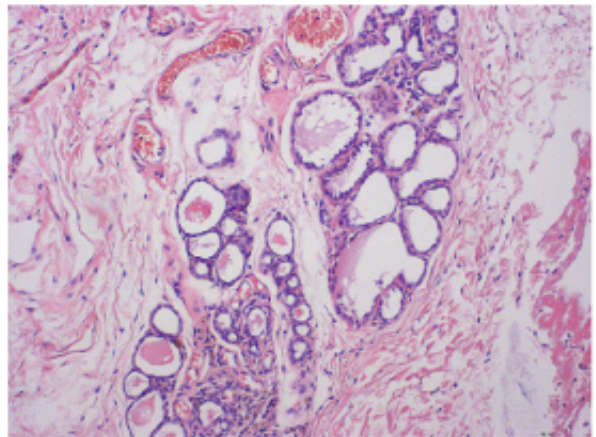


55 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

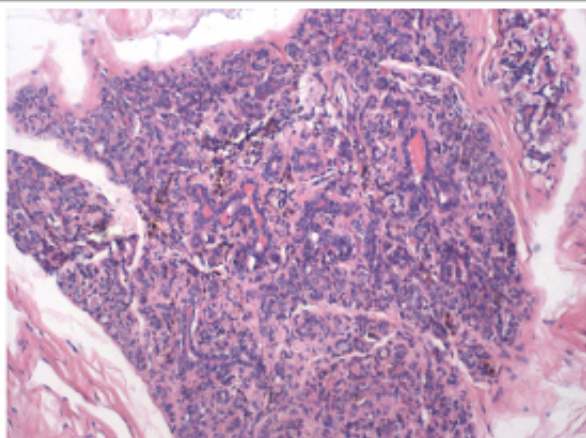




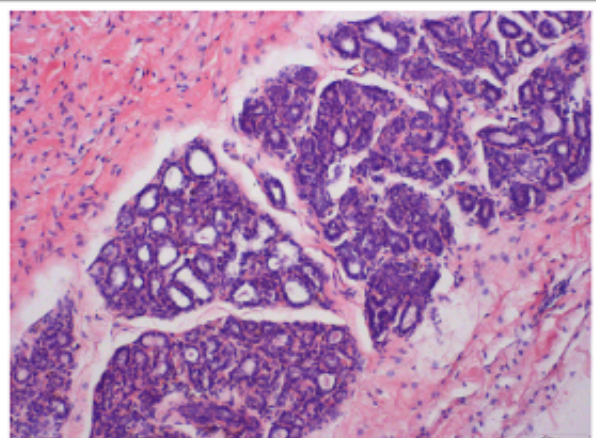
57 A: Einfaches, solides Karzinom



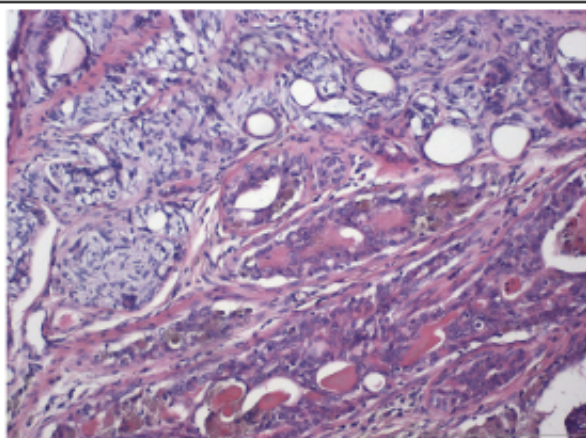
57 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe



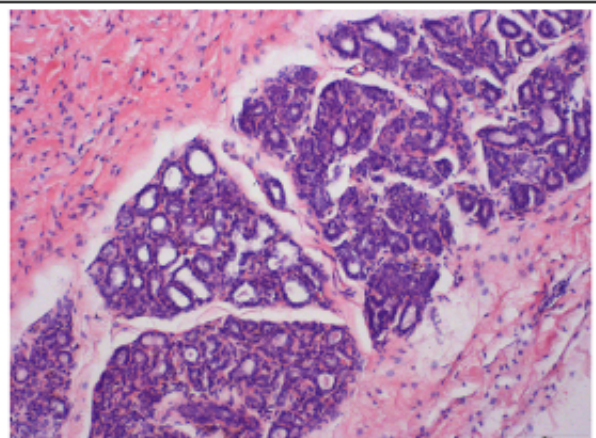
59 A: Einfaches, solides Karzinom



59 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

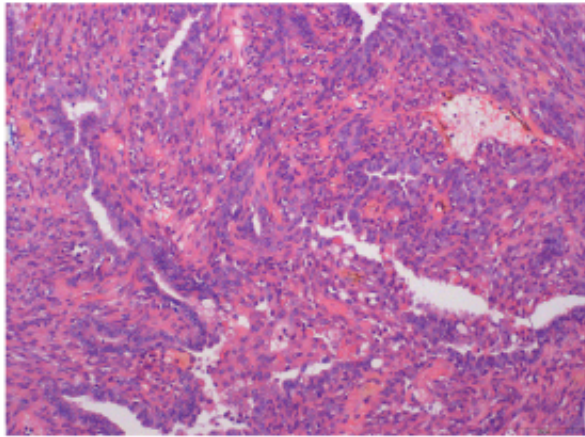


59 B: Komplexes Karzinom

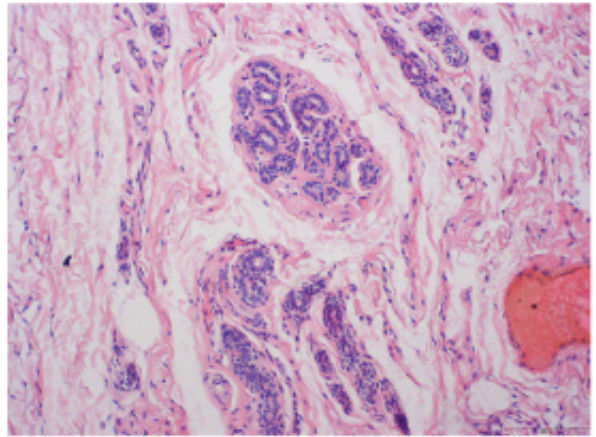


59 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe

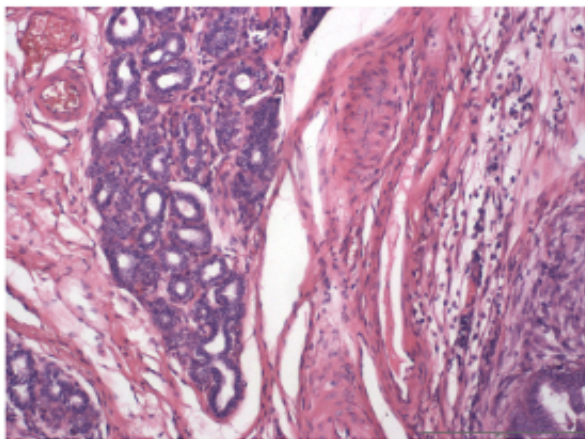




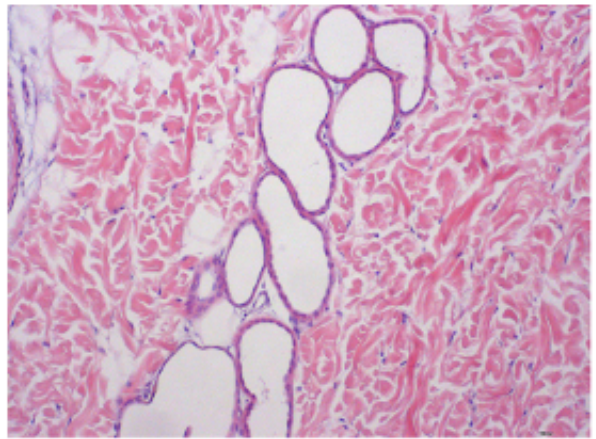
60 A: Einfaches, solides Karzinom



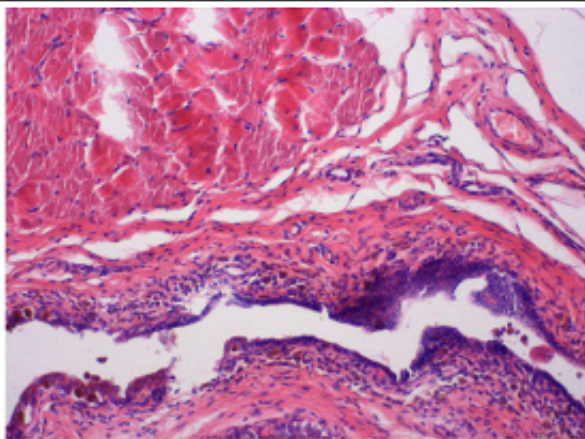
60 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe



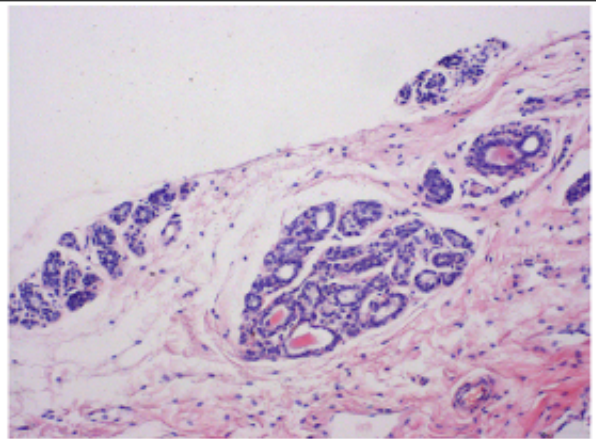
61 A: Komplexes Karzinom



61 N: Neoplastisch unverändertes Mammagewebe



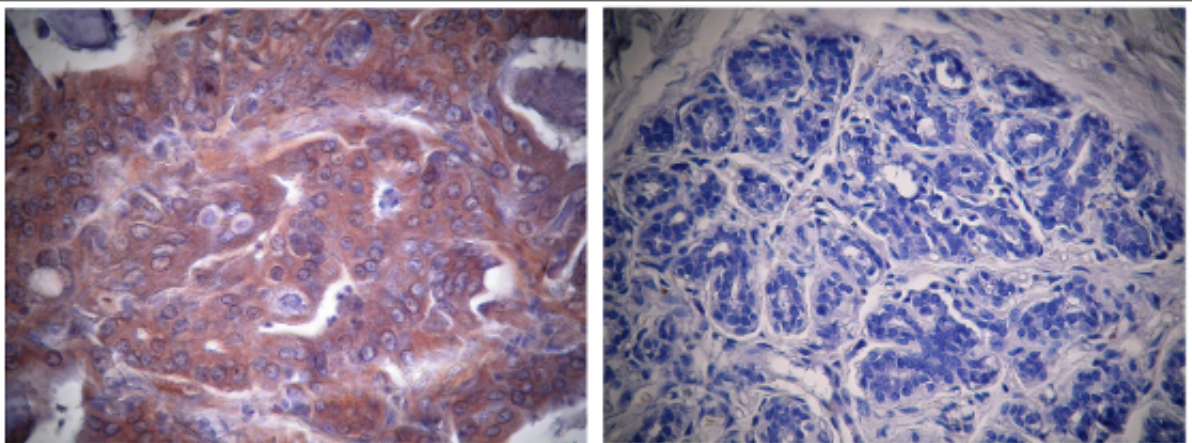
62 A: Komplexes Karzinom



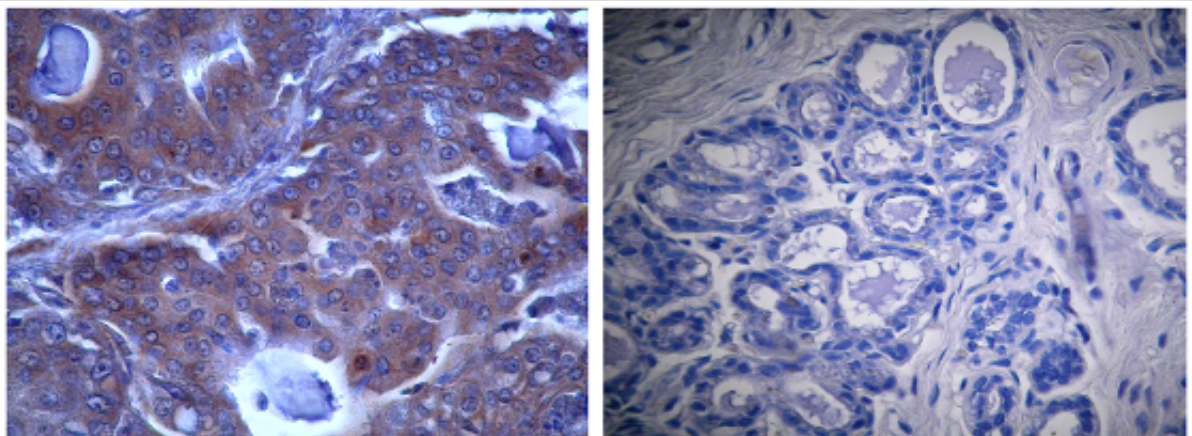
62 N: Morphologisch unverändertes Mammagewebe



**8.12 Fotografische Darstellung der immunhistochemischen Untersuchung von p21 in Mammakarzinomen im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe des gleichen Individuums (10-fache Vergrößerung)**

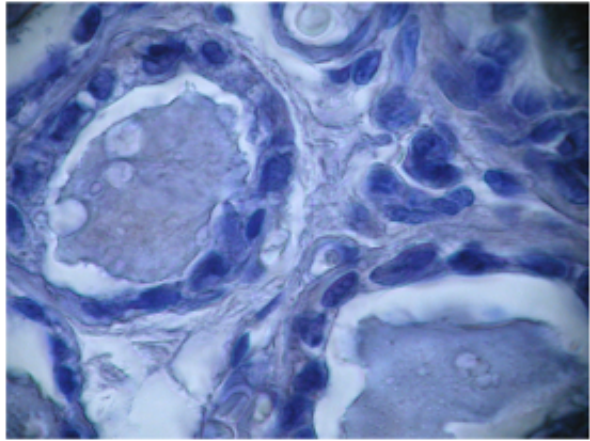
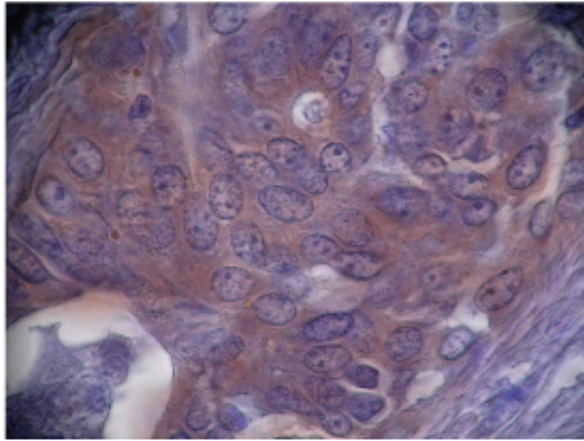


Immunhistochemische p21-Färbung; solides Karzinom (li.), neoplastisch unverändertes Drüsengewebe (re.); 20-er Vergrößerung; das p21-Antigen ist braun angefärbt (DAB).

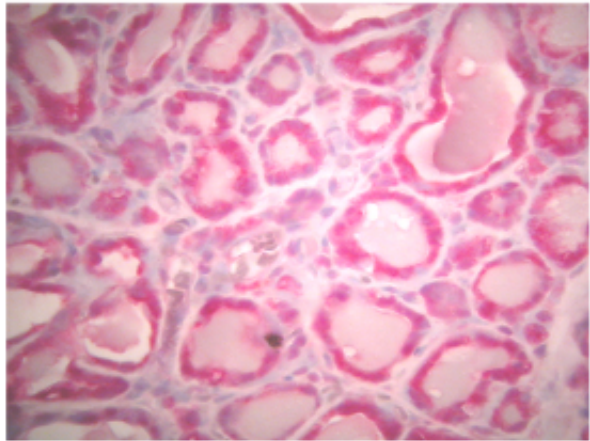
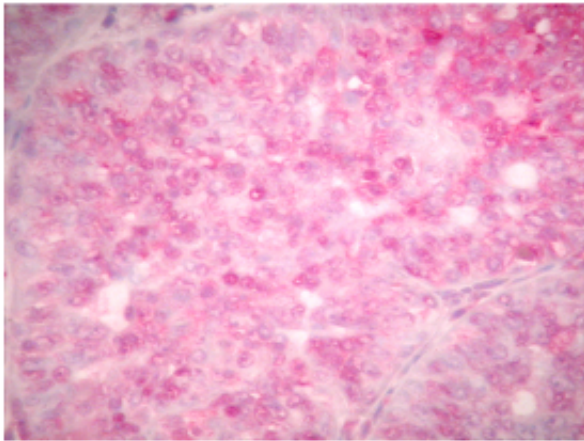


Immunhistochemische p21-Färbung; solides Karzinom (li.), neoplastisch unverändertes Drüsengewebe (re.); 20-er Vergrößerung; das p21-Antigen ist braun angefärbt (DAB).

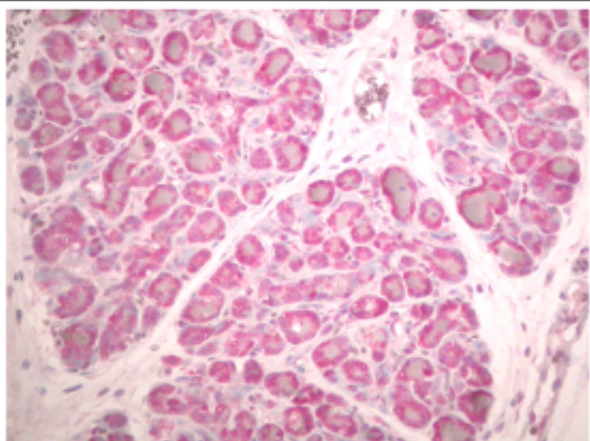
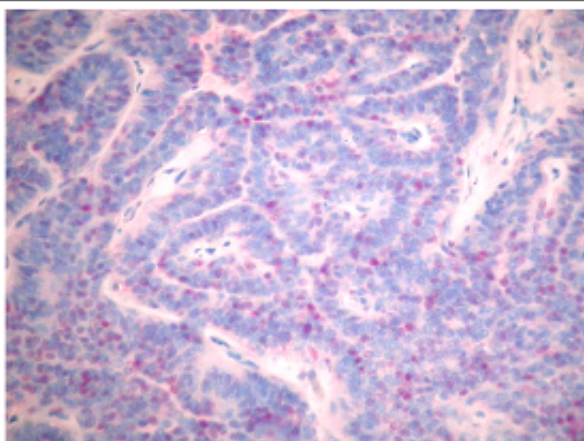




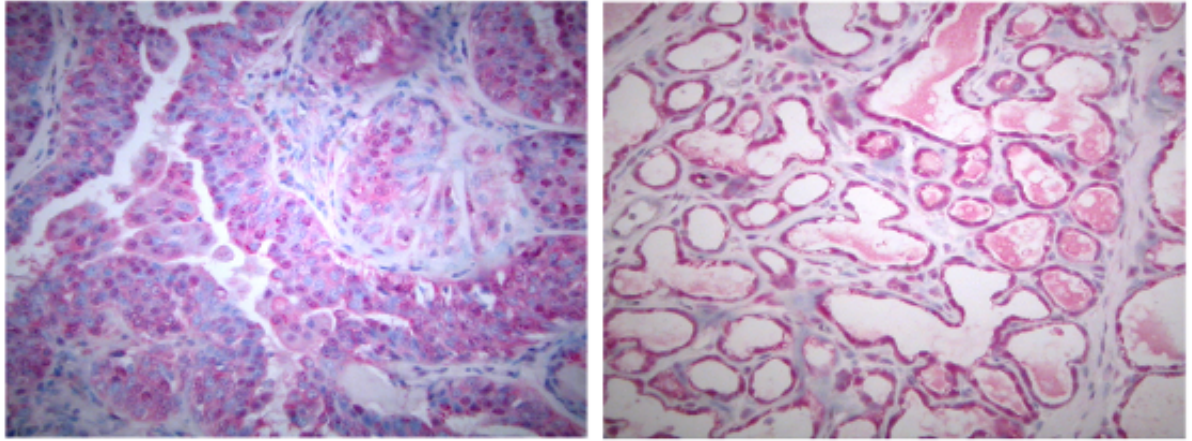
Immunhistochemische p21-Färbung; solides Karzinom (li.), neoplastisch unverändertes Drüsengewebe (re.); 100-er Vergrößerung; das p21-Antigen ist braun angefärbt (DAB)



Immunhistochemische p27-Färbung; solides Karzinom (li.), neoplastisch unverändertes Drüsengewebe (re.); 40-er Vergrößerung; das p27-Antigen ist rot angefärbt (Neufuchsin).



Immunhistochemische p27-Färbung; solides Karzinom (li.), neoplastisch unverändertes Drüsengewebe (re.); 10-er Vergrößerung; das p27-Antigen ist rot angefärbt (Neufuchsin).



Immunhistochemische p27-Färbung; solides Karzinom (li.), neoplastisch unverändertes Drüsengewebe (re.); 10-er Vergrößerung; das p27-Antigen ist rot angefärbt (Neufuchsin).



## 8.13 C<sub>T</sub>-Werte für p21 und p27

Tabelle 29 C<sub>T</sub>-Werte der Einzelproben für p21 (Rohdaten)

Tumor-Nr.	cDNA ID Basis	Ct β-Aktin Basis	Ct Target Basis	cDNA ID Test	Ct β-Aktin Test	Ct Target Test
<b>5</b>	432.1	20,27	26,66	158.1	20,31	28,1
<b>5</b>	432.1	20,27	26,66	433.1	20,25	28,93
<b>5</b>	432.2	21,3	23,9	158.1	20,31	28,1
<b>5</b>	432.2	21,3	23,9	433.2	21,53	25,8
<b>8</b>	434.1	20,04	27,93	1021.1	19,23	25,07
<b>8</b>	434.2	21,07	25,6	161.1	22,37	28,88
<b>9</b>	195.2	22	26,95	203.1	21,16	28,33
<b>9</b>	195.2	22	26,95	203.2	22,6	27,37
<b>9</b>	202.1	21,42	29,1	203.1	21,16	28,33
<b>13</b>	196.1	20,46	26,79	189.1	21,23	24,69
<b>13</b>	196.1	20,46	26,79	197.1	20,28	26,78
<b>15</b>	438.1	21,75	29,25	439.1	19,05	25,41
<b>16</b>	440.1	21,95	30,6	441.1	20,75	27,66
<b>17A</b>	192.1	23,09	28,78	191.1	22,74	27,29
<b>17A</b>	192.1	23,09	28,78	191.2	22,3	25,83
<b>17B</b>	192.1	23,09	28,78	437.1	22,02	28,78
<b>17A</b>	192.2	23,37	26,83	191.1	22,74	27,29
<b>17A</b>	436.1	22,45	29,92	191.1	22,74	27,29
<b>17B</b>	436.1	22,45	29,92	437.1	22,02	28,78
<b>19</b>	1068.1	22,77	29,95	1067.1	22,07	28,87
<b>23</b>	1025.1	20,4	25,85	1024.1	18,9	24,03
<b>24</b>	1041.1	21,57	27,7	1037.1	19,1	24,8
<b>26</b>	1036.1	20,67	28,5	1064.1	18,8	25,55
<b>29</b>	1031.1	18,55	24,75	1030.1	19,87	25,6
<b>32</b>	1027.1	21,93	29,05	1026.1	19,27	25,9
<b>45</b>	1240.2	18,9	24,1	1243.2	18	26,95
<b>47</b>	1249.2	17,53	25,83	1250.2	17,56	24,5
<b>53</b>	1407.2	17,7	28	1406.2	17,83	26,15
<b>54</b>	1410.2	18,93	28,55	1409.2	17,6	24,63
<b>55</b>	1421.2	19,56	25,35	1414.2	19,8	26,25
<b>57</b>	1423.2	18,33	25,53	1418.2	17,63	24,2
<b>59A</b>	1456.2	18,93	25,73	1426.2	16,8	24,23
<b>59B</b>	1456.2	18,93	25,73	1427.2	17,86	24,75
<b>60</b>	1459.2	17,96	24,8	1476.2	17,83	24,4
<b>61</b>	1477.2	18,96	27,2	1480.2	17,83	24,95
<b>62</b>	1482.2	19,25	27,55	1484.2	18,83	27,15

**Tabelle 30** C<sub>T</sub>-Werte der Einzelproben für p27 (Rohdaten)

<b>Tumor-Nr.</b>	<b>cDNA ID Basis</b>	<b>Ct β-Aktin Basis</b>	<b>Ct Target Basis</b>	<b>cDNA ID Test</b>	<b>Ct β-Aktin Test</b>	<b>Ct Target Test</b>
<b>5</b>	432.1	20,27	24,29	433.1	20,25	24,47
<b>5</b>	432.1	20,27	24,29	433.2	21,53	24,27
<b>5</b>	432.2	21,3	23,73	433.1	20,25	24,47
<b>5</b>	432.2	21,3	23,73	433.2	21,53	24,27
<b>8</b>	434.1	20,04	25,19	1021.1	19,23	24,2
<b>8</b>	434.2	21,07	24,47	161.1	22,37	26,13
<b>9</b>	195.2	22	24,73	203.1	21,16	24,28
<b>9</b>	195.2	22	24,73	203.2	22,6	24,57
<b>9</b>	202.1	21,42	25,16	203.1	21,16	24,28
<b>9</b>	202.1	21,42	25,16	203.2	22,6	24,57
<b>13</b>	196.1	20,46	25,08	189.1	21,23	24,09
<b>13</b>	196.1	20,46	25,08	197.1	20,28	25,83
<b>13</b>	196.1	20,46	25,08	197.2	22,2	25,13
<b>15</b>	438.1	21,75	24,82	439.1	19,05	24,72
<b>16</b>	440.1	21,95	25,92	441.1	20,75	24,68
<b>17A</b>	192.1	23,09	26,83	191.1	22,74	26,03
<b>17A</b>	192.2	23,37	25,73	191.2	22,3	25,43
<b>17A</b>	436.1	22,45	25,84	191.1	22,74	26,03
<b>17A</b>	436.1	22,45	25,84	191.2	22,3	25,43
<b>17B</b>	436.1	22,45	25,84	437.1	22,02	26,46
<b>19</b>	1068.1	22,77	25,6	1067.1	22,07	25,4
<b>23</b>	1025.1	20,4	24,75	1024.1	18,9	23,7
<b>24</b>	1041.1	21,57	25,6	1037.1	19,1	24,47
<b>26</b>	1036.1	20,67	24,8	1064.1	18,8	23,57
<b>29</b>	1031.1	18,55	23,15	1030.1	19,87	24
<b>30</b>	1071.1	20,67	23,73	1040.1	20,5	23,83
<b>32</b>	1027.1	21,93	24,33	1026.1	19,27	23,77
<b>45</b>	1240.2	18,9	24,53	1243.2	18	23,23
<b>47</b>	1249.2	17,53	22,75	1250.2	17,56	24,06
<b>53</b>	1407.2	17,7	25,2	1406.2	17,83	25
<b>54</b>	1410.2	18,93	23,5	1409.2	17,6	25,35
<b>55</b>	1421.2	19,56	25,05	1414.2	19,8	24,85
<b>57</b>	1423.2	18,33	23,33	1418.2	17,63	23,45
<b>59A</b>	1456.2	18,93	23,9	1426.2	16,8	22,9
<b>59B</b>	1456.2	18,93	23,9	1427.2	17,86	23,9
<b>60</b>	1459.2	17,96	22,06	1476.2	17,83	24,2
<b>61</b>	1477.2	18,96	24,2	1480.2	17,83	24,13
<b>62</b>	1482.2	19,25	23,93	1484.2	18,83	23,8

## 8.14 FC-Werte für p21 und p27

**Tabelle 31** FC-Werte der Einzelproben für p21 (Rohdaten)

<b>Proben-Nr.</b>	<b>cDNA Basis</b>	<b>cDNA Target</b>	<b>FC-Wert</b>
<b>5</b>	432.1	158.1	0,38
<b>5</b>	432.1	433.1	0,2
<b>5</b>	432.2	158.1	0,03
<b>5</b>	432.2	433.2	0,31
<b>8</b>	434.1	1021.1	4,14
<b>8</b>	434.2	161.1	0,25
<b>9</b>	195.2	203.1	0,21
<b>9</b>	195.2	203.2	1,31
<b>9</b>	202.1	203.1	1,42
<b>13</b>	196.1	189.1	7,31
<b>13</b>	196.1	197.1	0,89
<b>15</b>	438.1	439.1	2,2
<b>16</b>	440.1	441.1	3,34
<b>17</b>	192.1	191.1	2,2
<b>17</b>	192.1	191.2	4,47
<b>17</b>	192.1	437.1	0,48
<b>17</b>	192.2	191.1	0,47
<b>17</b>	436.1	191.1	7,57
<b>17</b>	436.1	437.1	1,64
<b>19</b>	1068.1	1067.1	1,3
<b>23</b>	1025.1	1024.1	1,25
<b>24</b>	1041.1	1037.1	1,35
<b>26</b>	1036.1	1064.1	2,11
<b>29</b>	1031.1	1030.1	1,39
<b>32</b>	1027.1	1026.1	1,4
<b>45</b>	1240.2	1243.2	0,07
<b>47</b>	1249.2	1250.2	2,57
<b>53</b>	1407.2	1406.2	3,94
<b>54</b>	1410.2	1409.2	6,02
<b>55</b>	1421.2	1414.2	0,63
<b>57</b>	1423.2	1418.2	1,55
<b>59</b>	1456.2	1426.2	0,65
<b>59</b>	1456.2	1427.2	0,94
<b>60</b>	1459.2	1476.2	1,21
<b>61</b>	1477.2	1480.2	2,17
<b>62</b>	1482.2	1484.2	0,99

**Tabelle 32** FC-Werte der Einzelproben für p27 (Rohdaten)

<b>Proben-Nr.</b>	<b>cDNA Basis</b>	<b>cDNA Target</b>	<b>FC-Wert</b>
<b>5</b>	432.1	433.1	0,87
<b>5</b>	432.1	433.2	2,43
<b>5</b>	432.2	433.1	0,29
<b>5</b>	432.2	433.2	0,81
<b>8</b>	434.1	1021.1	1,13
<b>8</b>	434.2	161.1	0,78
<b>9</b>	195.2	203.1	0,76
<b>9</b>	195.2	203.2	1,69
<b>9</b>	202.1	203.1	1,54
<b>9</b>	202.1	203.2	3,41
<b>13</b>	196.1	189.1	3,39
<b>13</b>	196.1	197.1	0,52
<b>13</b>	196.1	197.2	3,23
<b>15</b>	438.1	439.1	0,16
<b>16</b>	440.1	441.1	1,03
<b>17A</b>	192.1	191.1	1,37
<b>17A</b>	192.2	191.2	0,59
<b>17A</b>	436.1	191.1	1,07
<b>17A</b>	436.1	191.2	1,2
<b>17B</b>	436.1	437.1	0,48
<b>19</b>	1068.1	1067.1	0,71
<b>23</b>	1025.1	1024.1	0,73
<b>24</b>	1041.1	1037.1	0,4
<b>26</b>	1036.1	1064.1	0,64
<b>29</b>	1031.1	1030.1	1,39
<b>30</b>	1071.1	1040.1	0,83
<b>32</b>	1027.1	1026.1	0,23
<b>45</b>	1240.2	1243.2	1,32
<b>47</b>	1249.2	1250.2	0,41
<b>53</b>	1407.2	1406.2	1,26
<b>54</b>	1410.2	1409.2	0,11
<b>55</b>	1421.2	1414.2	1,36
<b>57</b>	1423.2	1418.2	0,57
<b>59A</b>	1456.2	1426.2	0,46
<b>59B</b>	1456.2	1427.2	0,48
<b>60</b>	1459.2	1476.2	0,21
<b>61</b>	1477.2	1480.2	0,48
<b>62</b>	1482.2	1484.2	0,82