Aus dem Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Malignitätsassoziierte Proteinexpressionsprofile von Derlin-1, TGF-β, LTBP-4, p27 und RAD51 in metastasierenden Mammatumoren des Hundes

> Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

> vorgelegt von Mareice Schütze Tierärztin aus Königs Wusterhausen

> > Berlin 2010 Journal-Nr.: 3409

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	Prof. Dr. med. vet. Robert Klopfleisch
Zweiter Gutachter:	UnivProf. Dr. med. vet. Karl Dietrich Weyrauch
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. med. vet. Corinna Eule

#### Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Dogs, mammary gland neoplasms, immunohistochemistry, metastasis, mammary glands, adenoma, adenocarcinoma, lymph nodes, neoplasms, mammary gland diseases, lymphatic system

Tag der Promotion: 23.11.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek* 

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <a href="http://dnb.ddb.de">http://dnb.ddb.de</a> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-873-9 **Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010** Dissertation, Freie Universität Berlin **D 188** 

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law. No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

 

 Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

 © Mensch und Buch Verlag 2010
 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

 In Erinnerung an meine Omi

# **INHALTSVERZEICHNIS**

Ι	<u>ABKÜ</u>	JRZUNGSVERZEICHNIS	I
1	<u>EINL</u>	EITUNG	1
2	<u>LITE</u>	RATURÜBERSICHT	3
2.1	Milch	drüse der Hündin – Anatomie und Histologie	3
2.2	Milch	drüsentumore der Hündin	4
2.2	2.1	Epidemiologie	4
2.2	2.2	Histopathologische Klassifikation	5
	2.2.2.1	Epitheliale Tumore	6
	2.2.2.2	Mesenchymale Tumore	7
	2.2.2.3	Komplexe und Mischtumore	7
2.2	2.3	Prognose	7
2.2	2.4	Ätiologie	8
2.3	Derlin	-1	11
2.3	8.1	Derlin-1-Proteinstruktur und Funktion	11
2.3	8.2	Derlin-1-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe	11
2.4	Trans	forming Growth Factor-β (TGF-β)	12
2.4	l.1	TGF-β-Proteinstruktur und Funktion	12
2.4	1.2	TGF-β-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe	13
2.5	Laten	t TGF-β binding protein (LTBP)	
2.5	5.1	LTBP-Proteinstruktur und Funktion	14
2.5	5.2	LTBP-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe	15
2.6	Cyclin	a-abhängiger Kinase-Inhibitor 1B (p27)	
2.6	5.1	p27-Proteinstruktur und Funktion	16
2.6	5.2	p27-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe	17
2.7	RAD5	1	
2.7	7.1	RAD51-Proteinstruktur und Funktion	19

2.7	.2	RAD51-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe	20
3	ARBE	CITSHYPOTHESE UND VERSUCHSPLANUNG	22
4	MATI	ERIAL UND METHODEN	23
4.1	Patien	tenkollektiv-Probenmaterial	23
4.2	Aufbe	reitung der Gewebeproben und Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
4.3	Histop	oathologische Klassifikation	23
4.4	Immu	nhistochemische Untersuchungen	24
4.4	.1	Aufbereitung der Proben	24
4.4	.2	Immunhistochemische Färbung	24
	4.4.2.1	Verwendete Primärantikörper	25
	4.4.2.2	Verwendete Sekundärantikörper	26
	4.4.2.3	ABC-Methode	27
4.4	.3	Spezifitätskontrollen	27
4.4	.4	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung	28
	4.4.4.1	Derlin-1	28
	4.4.4.2	TGF-β, LTBP-4, p27	28
	4.4.4.3	RAD51	28
4.4	.5	Statistische Auswertung	29
5	<u>ERGE</u>	CBNISSE	31
5.1	Lichtr	nikroskopische Untersuchung der HE-gefärbten Schnittpräparate	31
5.2	Patien	tenkollektiv	32
5.2	2.1	Rasseverteilung	33
5.2	2.2	Tumorlokalisation	34
5.3	Lichtr	nikroskopische Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen	35
5.3	.1	Derlin-1	35
5.3	.2	ΤGF-β	38
5.3	.3	LTBP-4	42
5.3	.4	p27	46
5.3	.5	RAD51	49

5.4	Korrelation des Expressionsniveaus der verschiedenen Proteine			
6	DISKUSSION	54		
6.1	Derlin-1: Ein Marker der <i>Unfolded protein response</i> ist erhöht exprimiert in malignen caninen Mammatumoren	. 54		
6.2	Der Proliferationshemmer TGF-β und seinem Bindungsprotein LTBP-4 zeigen eine verminderte Expression in malignen caninen Mammatumoren	56		
6.3	Expressionsverlust des negativen Zellzyklusregulators p27 in caninen Mammatumoren	. 58		
6.4	Erhöhte RAD51-Expression als Marker für genomische Instabilität in caninen Mammatumoren	. 59		
7	ZUSAMMENFASSUNG	. 62		
8	SUMMARY	.64		
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	66		
10	TABELLENVERZEICHNIS	.67		
11	LITERATURVERZEICHNIS	. 69		
12	ANHANG	85		
12.1	Anhang zum Kapitel Material und Methoden	.85		
12.	1.1 Tabelle des Untersuchungsmaterials	85		
12.	1.2 Geräte für die Herstellung von Paraffinschnitten	. 88		
12.	1.3 Verbrauchsmaterialien für die Herstellung von Paraffinschnitten	. 88		
12.	1.4 Protokoll für die HE-Färbung	. 89		
12.	1.5 Lösungen für die HE-Färbung	. 89		
12.	1.6 Protokoll für die immunhistochemische Färbung	. 89		
12.	1.7 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung	91		
12.	1.8 Lösungen und Puffer für die immunhistochemische Färbung	.92		
12.2	Anhang der immunhistochemischen Auswertung	.94		

13	DANKSAGUNG	
14	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	

# I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AD	Adenom
AK	Adenokarzinom
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BRCA	Breast Cancer susceptibility gene
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
	(engl. Cyclin-dependent kinase)
CDKI	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
	(engl. Cyclin-dependent kinasebinhibitor)
DAB	3.3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
engl.	Englisch / aus dem Englischen
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER-a	Estrogen Rezeptor-α
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Degradation
EZM	Extrazelluläre Matrix
et al.	et alii (und andere)
Fa.	Firma
ggrd.	Geringgradig
H <sub>0</sub>	Nullhypothese
HE	Hämatoxylin-Eosin
hgrd.	Hochgradig
IVTZ	Intravasale Tumorzellen
INK	Inhibitoren von Kinasen (engl. Kinase inhibitors)
k.A.	Keine Angabe
KIP	Kinase-inhibierendes Protein

LAP	Latent-assoziiertes Protein
	(engl. Latency-associated protein)
LLC	Großer latenter Komplex (engl. Large latent complex)
LKM	Lymphknotenmetastase
LTBP	Latentes TGF-  Bindungsprotein
	(engl. Latent TGF- $\beta$ binding protein)
MCF7	Humane Milchdrüsenkarzinomzelllinie
mgrd.	Mittelgradig
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. Messenger ribonucleic acid)
МК	Mammakomplex
NG	Normalgewebe
p27	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1B
PR	Progesteron Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. Phosphat buffered saline)
pН	Negativer dekadischer Logarithmus der
	Wasserstoffionenkonzentration (lat. potentia Hydrogenii)
SLC	Kleiner latenter Komplex (engl. Small latent complex)
ssDNA	Einzelstrang-DNA (engl. single stranded DNA)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor-β
	(engl. <i>Transforming growth factor-</i> $\boldsymbol{\beta}$ )
ΤβR	Transformierender Wachstumsfaktor-β Rezeptor
	(engl. <i>Transforming growth factor-β receptor</i> )
UPR	Fehlgefaltete Proteinantwort (engl. Unfolded protein response)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organisation)
x <sup>2</sup> -Test	Chi-Quadrat-Test nach Pearson

# 1 Einleitung

Milchdrüsentumore (Mammatumore) gehören zu der am häufigsten diagnostizierten Neoplasie beim Hund (Eichelberg and Seine 1996). Veränderungen in der Gesäugeleiste treten bei ca. der Hälfte der weiblichen Tiere auf, wobei der Anteil maligner Tumore auf bis zu 50% geschätzt wird (Argyle et al. 2008; Brodey et al. 1983; Mac Ewen and Withrow 1996; Morrison 1998). Gemessen an der hohen Inzidenz caniner Mammatumore ist bislang nur wenig bekannt über die Ursache von Entstehung und Progression. Prinzipiell ist jedoch anzunehmen, dass wie bei anderen Säugetierarten, Proteine der Zellzyklus- und Proliferationskontrolle, der Apoptose und der DNA-Reparaturmechanismen in caninen Mammatumoren ein verändertes Expressionsniveau und eine veränderte Funktion haben.

So konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der *Transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ -Familie eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Zelldifferenzierung und Proliferation einnehmen. Ihre Verfügbarkeit und Prozessierung wird von dem Latenten TGF- $\beta$ -Bindungsprotein (LTBP) reguliert. Die Expressionsmuster von TGF- $\beta$  und LTBP in normalem und neoplastisch verändertem Milchdrüsengewebe des Hundes sind unbekannt. Eine Funktion von TGF- $\beta$  ist die transkriptionelle Aktivierung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 1B (p27). Eine verminderte TGF- $\beta$ -Expression hätte somit eine direkte Auswirkung auf die Regulation des Zellzyklus. Störungen bei der Regulation des Zellzyklus sind ein wichtiger Schritt bei der Entstehung von Tumoren, wobei eine Untersuchung der p27-Expression in caninen Mammatumoren bisher nicht erfolgte.

Eine weitere typische Eigenschaft von Tumoren ist ihre genetische Instabilität. Es wird dabei angenommen, dass zum einen durch die erhöhte DNA-Replikation und zum anderen durch die eingeschränkte Funktion von DNA-Reparaturenzymen Mutationen im Erbgut der Tumorzellen akkumulieren. Ein wichtiges DNA-Reparaturenzym ist RAD51, welches essentiell für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist. Der Einfluss von RAD51 auf die Entstehung von humanem Brustkrebs wurde hinreichend gezeigt, während ähnliche Untersuchungen beim Hund fehlen.

Die Reaktionsfähigkeit der Tumorzellen auf Veränderungen des extrazellulären Mikromilieus ist ebenfalls ein wichtiger Aspekt bei der Tumorentwicklung und Progression. So sind Tumorzellen dadurch gekennzeichnet, sich an suboptimale Bedingungen, wie Hypoxie oder Nährstoffmangel, anpassen und überleben zu können. Eine wichtige Rolle spielen dabei Proteine der *Unfolded protein response* (UPR) wie Derlin-1, welches über die Beseitigung

fehlgefalteter Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in Stresssituationen zytoprotektiv wirkt. So zeigen insbesondere maligne humane Mammatumore eine erhöhte Derlin-1-Expression. Das Expressionsniveau in caninen Mammatumoren ist unbekannt, eine ähnliche Rolle der UPR bei der Tumorentwicklung bei Hunden wird jedoch zumindest bei Osteosarkomen vermutet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Proteinexpressionen von Derlin-1, TGF- $\beta$ , LTBP-4, p27 und RAD51 in normalen Milchdrüsen, Milchdrüsenadenomen, Milchdrüsenkarzinomen und ihren Lymphknotenmetastasen zu vergleichen. Anhand dieser Untersuchungen sollte geklärt werden, ob das Expressionsniveau dieser für die Karzinogenese von humanen Mammatumoren wichtigen Proteine auch eine Rolle bei der Entstehung caniner Milchdrüsentumore spielen könnte.

# 2 Literaturübersicht

#### 2.1 Milchdrüse der Hündin - Anatomie und Histologie

Die Milchdrüse des Hundes erstreckt sich über zwei Gesäugeleisten, die von thorakal bis inguinal bilateral-symmetrisch an der ventralen Bauchwand verlaufen. Eine Trennung der Leisten erfolgt in der *Linia alba* durch den *Sulcus intermammarius*. Allgemein befinden sich fünf Drüsenkomplexe auf jeder Seite, jedoch kann die Anzahl zwischen vier oder sechs variieren (Harvey 1990). Für die Einteilung der Mammakomplexe (MK) bestehen verschiedene Nomenklatursysteme. Nach Warner (1976) werden die Drüsenabschnitte von kranial nach kaudal unterteilt in thorakal kranial, thorakal kaudal, abdominal kranial, abdominal kaudal und inguinal (Warner 1976).

Die Milchdrüse des Hundes ist eine zusammengesetzte, modifizierte, apokrine Schweißdrüse mit einem tubuloalveolärem Aufbau (Harvey 1990). Jeder MK ist identisch aufgebaut und besteht aus einem Drüsenkörper, *Corpus mammae*, und einer Zitze, *Papilla mammae*. Die Milchdrüse besteht aus dem Drüsenparenchym mit dem interstitiellen Bindegewebe und einem Ausführungsgangsystem, das in einer Eversionszitze mündet. Die Alveole, als Ort der Milchbildung und der Milchabgabe, stellt zusammen mit dem direkt anliegenden Myoepithel die kleinste Einheit des Drüsengewebes dar. Die nachstehende Einheit des Hohlraumsystems bilden die intra- und anschließenden interlobulären Ausführungsgänge, die *Ductus lactiferri*. Es kommt zu einer Vereinigung von größeren Milchgängen, die in einer säckchenförmigen Zitzenzysterne münden. Ca. 6-20 Strichkanäle, *Ducti papillaris*, münden auf der Zitzenkuppe und dienen somit als Verbindungsstück zwischen Zitzenzysterne und Außenwelt.

Histologisch werden im Gesäuge epitheliale und mesenchymale Anteile unterschieden. Die Alveole besteht aus einem einschichtigen Drüsenepithel, das je nach Laktationszeitpunkt als abgeplattet bis hochprismatisch in Erscheinung tritt. Diese Zellen sind zur Milchsynthese befähigt, und die Milchabgabe erfolgt über eine apokrine Sekretion. Zwischen dem Drüsenepithel und der Basalmembran befinden sich Myoepithelzellen, die netzartig um die Alveole sowie um die Anfangsabschnitte der Milchausführungsgänge angeordnet sind. Sie besitzen Oxytocinrezeptoren und haben eine wichtige Aufgabe im Hinblick auf die Milchejektion. Trotz seiner muskelartigen Kontraktionskraft gehört das Myoepithel zum epithelialen Gewebe. Die proximal gelegenen Milchausführungsgänge besitzen ebenfalls ein einschichtiges Epithel, das noch zur Milchsynthese fähig ist. Die sich anschließenden weiter

Literaturübersicht

distalen Abschnitte werden von zweischichtigem Epithel ausgekleidet und übernehmen ausschließlich eine milchleitende Funktion. Die Innenauskleidung des Strichkanals besteht aus verhornter kutaner Schleimhaut (Liebich 2004).

Der Lymphabfluss erfolgt bilateral symmetrisch. Die Lymphgefäße des kranialen Versorgungsgebietes drainieren die Lymphe zum *Ln. axillaris* und zum *Ln. axillaris accessorius*. Von dort erfolgt der Weitertransport über den *Truncus jugularis* bis in den Venenwinkel. Bei den beiden kaudalen Drüsenpaaren erfolgt der Lymphabfluss zu den *Lnn. inguinales superficiales* und von dort aus weiter in Richtung der Darmbeinlymphknoten. Die Lymphe des kranialen abdominalen MK fließt entweder über das kraniale oder das kaudale Drüsenpaar zu den entsprechenden Lymphknoten. Nach Gutberlet (1996) bestehen zwischen den MK lymphatische Anastomosen, die hinsichtlich des Metastasierungsweges von wichtiger Bedeutung sein können (Gutberlet and Rudolph 1996).

#### 2.2 Milchdrüsentumore der Hündin

#### 2.2.1 Epidemiologie

Canine Milchdrüsentumore (Mammatumore) gehören zu den Neoplasien mit der höchsten Inzidenz beim weiblichen Hund (Eichelberg and Seine 1996). Tumoröse Veränderungen der Gesäugeleiste treten bei ca. 52% der weiblichen Tiere auf (Mac Ewen and Withrow 1996; Simon et al. 1996), wobei in selten Fällen auch Rüden betroffen sein können. Das Risiko liegt hier jedoch bei weniger als 1% (Withrow and MacEwen 2001).

Die Inzidenz caniner Gesäugetumore nimmt ab dem 7. Lebensjahr zu und erreicht ihren Höhepunkt zwischen dem 10. und 14. Lebensjahr (Gottwald 1998; Schneider 1970). Das Auftreten von malignen Tumoren steigt dabei mit zunehmendem Alter an (Bostedt and Tammer 1995). Ein gehäuftes Auftreten von Milchdrüsentumoren wurde bei Spanielrassen, Dackeln und Pudeln beschrieben (Eskens 1983; Gottwald 1998; Priester and McKay 1980). Diese Rassedispositionen konnten jedoch in weiteren Studien nicht bestätigt werden.

Das Auftreten neoplastischer Veränderungen im Gesäuge des Hundes kann solitär oder, wie in mehr als der Hälfte der Fälle, multipel sein (Withrow and MacEwen 2001). Dabei ist jede Zubildung individuell zu betrachten, da die Tumore meist verschiedene histologische Subtypen bzw. Dignitäten aufweisen. Bezüglich der Lokalisation caniner Gesäugetumore sind in 65%-70% der Hunde die MK 4 und 5 betroffen. Als mögliche Erklärung wird das größere

Volumen an Milchdrüsengewebe in diesen Komplexen diskutiert (Withrow and MacEwen 2001).

Die Angaben über die Häufigkeit von malignen Mammatumoren bezogen auf die Gesamtzahl der diagnostizierten Gesäugetumore sind in der Literatur uneinheitlich. Die Spannweite reicht dabei von 10% bis 75%, wobei überwiegend Prozentzahlen zwischen 41% und 53% zu finden sind (Argyle et al. 2008; Brodey et al. 1983; Gilbertson et al. 1983; Morrison 1998).

#### 2.2.2 Histopathologische Klassifikation

Die Einteilung caniner Mammatumore erfolgt bisher ausschließlich über histopathologische Kriterien. Dabei stehen verschiedene Klassifizierungssysteme zur Verfügung, wobei für die vorliegende Arbeit eine Einteilung nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organisation*, WHO) erfolgte.

Histological Classification				
Š.	of Mamma	ary Tumor		
A	of th	e dog		
Malignant T	umors	Benign Tumors		
1.1 Noninfilt	rating (in situ) carcinoma	2.1 Adenoma		
1.2 Complex	carcinoma	2.1.1	Simple adenoma	
1.3 Simple ca	arcinoma	2.1.2	Complex adenoma	
1.3.1	Tubulopapillary carcinoma	2.1.3	Basaloid adenoma	
1.3.2	Solid carcinoma	2.2 Fibroad	enoma	
1.3.3	Anaplastic carcinoma	2.2.1	Low-cellularity fibroadenoma	
1.4 Special types of carcinomas		2.2.2	High-cellularity fibroadenoma	
1.4.1 Spindle cell carcinoma		2.3 Benign mixed tumor		
1.4.2 Squamous cell carcinoma		2.4 Duct papilloma		
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				

Abbildung 1: Ausschnitt aus den WHO-Richtlinien zur histopathologischen Klassifikation caniner Mammatumore (Misdorp et al. 1999).

### 2.2.2.1 Epitheliale Tumore

Epitheliale Tumore bilden den größten Anteil an Mammatumoren beim Hund. Bei alleiniger Beteiligung der Alveolarschicht ohne myoepithelialen Anteil spricht man von einem Adenom respektive Adenokarzinom des einfachen Typs. Diese können im Falle der Karzinome tubulär bzw. papillär aufgebaut sein. Fehlt die Ausbildung eines Tubuluslumens, so spricht man von soliden Tumoren. Besteht die Neoplasie aus sekretorischem Epithel und Myoepithel, bezeichnet man die entsprechenden benignen bzw. malignen Tumore als komplexen Typ (Kessler 1999).

#### 2.2.2.2 Mesenchymale Tumore

Die alleinige Beteiligung des mesenchymalen Keimblattes bei der Progression von caninen Mammatumoren kommt in ca. 3% der Fälle vor (Gottwald 1998). Sie werden je nach Dignität in Fibrome bzw. Sarkome unterteilt. Am häufigsten werden in dieser Gruppe Osteo- und Fibrosarkome diagnostiziert (Kessler 1999).

#### 2.2.2.3 Komplexe und Mischtumore

Besteht die Neoplasie aus sekretorischem Epithel und Myoepithel, bezeichnet man die entsprechenden benignen bzw. malignen Tumore als komplexes Adenom oder Karzinom (Kessler 1999). Ein benigner Mammamischtumor besteht sowohl aus neoplastischen Epithelzellen als auch aus proliferativen, mesenchymalen Gewebe, das gut differenzierten Knorpel und Knochen enthält. Maligne Tumore, bei denen sowohl maligne entartete epitheliale als auch maligne entartete mesenchymale Tumorzellen vorkommen, werden als Karzinosarkome bezeichnet und kommen sehr selten vor (Kessler 1999).

#### 2.2.3 Prognose

Klinische Parameter, die für die Prognose von caninen Mammatumoren von Bedeutung sind, sind u.a. Tumorgröße, Abgrenzbarkeit zum umliegenden Gewebe, vorhandene Ulzerationen sowie Wachstumsrate (Fidler and Brodey 1967; Gilbertson et al. 1983; MacEwen et al. 1985; Misdorp and Hart 1979). In einigen Studien gilt das Alter des Hundes zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als prognostischer Parameter. Dabei haben ältere Tiere eine schlechtere Prognose im Vergleich zu ihren jüngeren Artgenossen (Hellmen et al. 1993; Schneider et al. 1969). Mammatumore, die klinische Anzeichen einer entzündlichen Veränderung im Bereich des Primärtumors zeigen, wie starke Rötung und Ödembildung, zeigen meist ein stark invasives Wachstum und eine frühzeitige Metastasierung und haben deshalb eine schlechte Prognose (White 1998). Häufig handelt es sich hierbei um anaplastische Karzinome, die bedingt durch die klinische Symptomatik initial fälschlicherweise als akute Mastitis diagnostiziert werden und in Anlehung an die humane Nomeklatur auch als *"inflammatory carcinomas"* bezeichnet werden.

Als wichtige histopathologische Prognosekriterien dienen Tumortyp sowie Differenzierungsgrad und Invasionsverhalten des Tumors am Übergang zum umgebenden Gewebe (Gilbertson et al. 1983; Hellmen et al. 1993; Misdorp and Hart 1979). Dabei nimmt der Malignitätsgrad von nicht-infiltrativ wachsenden Karzinomen über komplexe und einfache Karzinome bis hin zu den anaplastischen Karzinomen zu (Misdorp and Hart 1979).

Der Einbruch von Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße und der Nachweis von metastatischen Tumorzellen in den regionären Lymphknoten ist ebenfalls von großer prognostischer Relevanz. So ist eine verkürzte postoperative Überlebenszeit mit dem Vorhandensein einer Angiosis carcinomatosa bzw. einer Beteiligung der regionären Lymphknoten assoziiert (Fidler and Brodey 1967; Gilbertson et al. 1983; Hellmen et al. 1993). Die Angaben zur Häufigkeit von metastasierenden Mammatumoren schwanken in der Literatur. So konnten Fidler et al. bei 85% aller Karzinome eine Streuung feststellen (Fidler and Brodey 1967), wobei Hellmen eine Metastasierung bei nur 30% der untersuchten Karzinome diagnostizierte (Hellmen 1996). Bei dem weitaus größten Teil der metastasierenden Karzinome findet die Streuung über das lymphatische System statt (Morrison 1998). Eine hämatogene Metastasierung ist insbesondere bei Sarkomen beschrieben worden. So erkannten Misdorp et al. im Jahre 1966 bei dieser Tumorart, dass trotz stattgefundener Metastasierung die regionären Lymphknoten nur in etwa der Hälfte der Fälle mitbetroffen waren (Misdorp and Den Herder 1966). Am häufigsten sind Fernmetastasen in der Lunge nachweisbar, aber auch Organe wie Leber, Milz, Knochen, Gehirn, Haut und Nieren können gelegentlich Tochtergeschwülste aufweisen (Bostock 1986; Brodey et al. 1983).

Parameter ohne Einfluss auf die Prognose von caninen Mammatumoren sind u.a. die Tumorlokalisation sowie die Anzahl der Tumore, die Operationsweise und eine durchgeführte Ovariohysterektomie zum Zeitpunkt der Tumorexstirpation (Hellmen et al. 1993; Kurzmann and Gilbertson 1986; MacEwen et al. 1985; Misdorp and Hart 1976; Schneider et al. 1969; Yamagami et al. 1996). Weiterhin scheinen vorangegangene Scheinträchtigkeiten bzw. Abnormalitäten während des Östrus sowie die Anzahl der Würfe und das Alter bei der ersten Trächtigkeit keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose caniner Mammatumore zu haben (Brearley 1989).

#### 2.2.4 Ätiologie

Die Ätiologie caniner Mammatumore ist bislang nur unzureichend geklärt. Bisher konnte lediglich ein pro-kanzerogener Einfluss von Sexualhormonen auf die Tumorentstehung in zahlreichen Studien sicher nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen mit exogen applizierten Steroidhormonen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Gestagenen zur Läufigkeitsunterdrückung Milchdrüsenhyperplasien bedingt und gleichzeitig die Gefahr der Entstehung von benignen Mammatumoren um 40% steigert (Giles et al. 1978; Misdorp 1991). Bei kombinierter Gabe von hochdosierten Östrogen-Gestagen-Präparaten stieg hingegen das Risiko für maligne Milchdrüsentumore an (Casey et al. 1979; Giles et al. 1978; Misdorp 1991; Rutteman 1992).

Ferner besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der möglichen Entwicklung von Mammatumoren und dem Zeitpunkt der Kastration. Bei Hündinnen, die vor der ersten Läufigkeit ovariektomiert wurden, sinkt das Risiko der Entstehung eines Mammatumors auf 0,05%. Bei Kastrationen zwischen der ersten und der zweiten Läufigkeit sinkt es auf 8% und im Anschluss an den zweiten Östrus steigt das Risiko auf bereits 26% an (Brodey et al. 1983; Rutteman et al. 2001). Findet die Entfernung der Ovarien nach dem 2,5 Lebensjahr statt, konnte kein protektiver Effekt festgestellt werden. Das Risiko für die Entwicklung benigner Neoplasien scheint jedoch auch bei später stattfindenden Kastrationen zu sinken (Misdorp 1991; Schneider et al. 1969). Bedingt durch diese Feststellung postulierten Brodey et al. im Jahre 1983, dass sich während der ersten Östruszyklen präneoplastische Zellen etablieren, die nach einer gewissen Zeit eine Transformation in Tumorzellen erleben (Brodey et al. 1983). Das würde zum einen erklären, warum eine Kastration vor dem ersten Zyklus die Gefahr der Entstehung von caninen Mammatumoren so drastisch senkt und zum anderen den Verlust des protektiven Effektes nach dem 2,5 Lebensjahr verständlich machen. Sichere experimentelle Daten zur Unterstützung dieser Hypothese fehlen jedoch.

Der hormonelle Einfluss auf die Entwicklung von caninen Mammatumoren wurde auch auf molekularer Ebene verifiziert. So zeigten immunhistochemische Untersuchungen, dass mit steigender Malignität die Expression von Estrogen- (ER- $\alpha$ ) und Progesteronrezeptoren (PR) deutlich vermindert ist (de Las Mulas et al. 2005; MacEwen et al. 1982; Nieto et al. 2003; Rutteman et al. 1988; Yang et al. 2006).

Über weitere molekulare Mechanismen zur Entstehung bzw. Progression von Gesäugetumoren ist wenig bekannt. Wie bei anderen Tumorarten scheint die fehlerhafte Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle bei der Entstehung von caninen Mammatumoren zu spielen. So zeigten immunhistochemische Untersuchungen ein erhöhtes Expressionsniveau der aktivierenden Zellzyklusregulatoren Cyclin A und D1 in malignen caninen Mammatumoren (Murakami et al. 2000), die positiv mit der Proliferationsrate korellierten (Sfacteria et al. 2003). Welchen Einfluss die Zellzyklusinhibitoren (CDKI) als negative Regulatoren des Zellzyklus bei der Karzinogenese von Gesäugetumoren haben, wurde auf Proteinebene bislang nicht untersucht. Vielfach untersucht wurde dagegen das

Proteinprofil des Tumorsupressors p53, der wiederum die Expression zahlreicher CDKI sowie DNA-Reparaturenzyme aktiviert und die Apoptose einleiten kann. Verschiedene, teils widersprüchliche Expressionsstudien konnten bisher jedoch keinen sicheren Zusammenhang zwischen dem p53-Expressionsniveau und der Entstehung caniner Milchdrüsentumore herstellen (Kumaraguruparan et al. 2006b; Rodo and Malicka 2008; Rungsipipat et al. 1999). Die Regulation des Zellzyklus stellt ein wichtiges Instrument zur Sicherung der genetischen Information dar. Treten während der DNA-Replikation Schäden auf, kommt es zum Zellzyklusarrest und entsprechende Reparatursysteme werden aktiviert. Bei verminderter Expression oder Funktionsverlust dieser DNA-Reparatursysteme kommt es zur genomischen Instabilität, die eine Entstehung von Tumoren begünstigt. So konnte ein Zusammenhang zwischen Mutationen in den DNA-Schadenssensoren Breast Cancer susceptibility gene (BRCA) 1 und 2 und dem Auftreten familiärer, humaner Mammakarzinome gezeigt werden. Beide Genprodukte üben einen regulativen Einfluss auf die Expression von RAD51 aus, einem Protein, dessen explizite Aufgabe die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination ist (Venkitaraman 2002). An caninen Mammatumoren erfolgte bislang nur die Untersuchung der Proteinexpression von BRCA1 mit dem Ergebnis einer positiven Korrelation der Expression mit dem Malignitätsgrad (Nieto et al. 2003). Untersuchungen zur Proteinexpression von RAD51 in caninen Mammatumoren fehlen bislang.

Die während der Tumorentwicklung und -metastasierung stattfindenden Änderungen des Mikromilieus stellen für neoplastische Zellen Stresssituationen dar. Um ein Überleben unter suboptimalen Bedingungen (z.B. Hypoxie, Nährstoffmangel, pH-Verschiebung) zu gewährleisten, exprimieren Tumorzellen als adaptive Antwort eine Reihe zytoprotektiver Proteine. So konnte in immunhistochemischen Studien an caninen Mammatumoren bereits eine verstärkte Proteinexpression von Hitzeschockproteinen (HSP) in neoplastischen Geweben gezeigt werden, die eine Denaturierung zelleigener Proteine verhindern sollen (Kumaraguruparan et al. 2006a; Romanucci et al. 2006). Speziell intravasale Tumorzellemboli (IVTZ) zeigten ein besonders hohes HSP-Expressionsniveau, was auf eine mögliche Beteiligung dieser protektiven Stressproteine bei der Metastasierung von Milchdrüsentumoren hinweisen könnte (Romanucci et al. 2006). In humanem Brustkrebs konnte bereits eine erhöhte Expression des zytoprotektiven Proteins Derlin-1, einer Untereinheit der Unfolded protein response (UPR), insbesondere in malignen Brustkrebszellen gezeigt werden (Wang et al. 2008). Inwieweit neoplastische Zellen des caninen Gesäuges über Schutzmechanismen wie Derlin-1 verfügen, ist bislang noch unklar.

### 2.3 Derlin-1

#### 2.3.1 Derlin-1-Proteinstruktur und Funktion

Das *Degradation in endoplasmic reticulum protein*, kurz Derlin-1, ist ein 22 kDa schweres, hydrophobes Protein (Lilley 2004; Ye 2004).

Es besteht aus vier Transmembransegmenten, die möglicherweise einen proteinleitenden Kanal bilden. Das C- und das N-terminale Ende befinden sich dabei im Cytosol (Lilley 2004). Die Proteinsynthese und -modifikation im ER unterliegt strengen Qualitätskontrollen. Es handelt sich dabei vorrangig um die Faltung und Markierung von sekretorischen oder Transmembranproteinen, die anschließend zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Gelingt dieses Überführen in die Tertiärstruktur nicht vollständig bzw. fehlerhaft, kommt es zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine und somit zur Aktivierung der UPR. Im Rahmen der UPR werden Proteine exprimiert. die die Aktivierung der sogenannten endoplasmatischen Retikulum-assozierten Degradation (ERAD) einleiten (Zhang 2006). Man ging lange Zeit davon aus, dass der Abbau fehlgefalteter Proteine direkt im Lumen oder in der Membran des ER stattfindet (Klausner 1997). Heute weiß man, dass die entsprechenden Eiweiße über ein komplexes Proteinsystem in das Cytosol transloziert werden, um dort vom Proteasom abgebaut zu werden. Derlin-1 spielt eine zentrale Rolle im Proteintransportsystems des ERAD-Komplexes. Bei einer länger andauernden Stresssituation oder nicht ausreichenden Schutzmechanismen wird über das UPR der programmierte Zelltod eingeleitet (Rao 2004).

#### 2.3.2 Derlin-1-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe

Derlin-1 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein. Insbesondere in Leber, Milz, Pankreas, Lunge, Thymus und Ovarien finden sich jedoch erhöhte Derlin-1-Expressionen (Lilley and Ploegh 2005; Lilley 2004).

In neoplastischen Geweben wurde die Expression von Derlin-1 bisher ausschließlich in humanem Brustkrebs untersucht. Immunhistochemisch konnte dabei in 66% der untersuchten malignen, humanen Brusttumore eine erhöhte Derlin-1-Expression gezeigt werden, während im normalen Milchdrüsengewebe eine Expression nur in Einzelfällen zu beobachten war. Weiterhin wies das Derlin-1-Expressionsniveau eine positive Korrelation mit dem Tumorgrad bzw. der axillaren Lymphknotenmetastasierung auf (Wang 2008). Es wurde deshalb postuliert, dass ER-Stress und eine erhöhte Derlin-1-Expression kritische Faktoren bei der Mammatumorentstehung und –metastasierung darstellen (Wang 2008). Des Weiteren konnte

in Krebszelllinien mit einem Knockout im Derlin-1-Gen ein verstärktes Auftreten von Apoptosen festgestellt werden, was auf einen anti-apoptotischen Effekt von Derlin-1 hindeutet (Wang 2008).

Studien, die die Expression von Derlin-1 in caninen Mammatumoren untersuchen, liegen bislang nur auf mRNA-Ebene vor. Dabei konnte in der Mehrzahl der untersuchten Adenokarzinome und in 100% der Lymphknotenmetastasen eine Derlin-1-Überexpression festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten Adenome überwiegend eine reduzierte Derlin-1-Expression (Klopfleisch and Gruber 2008). Es ist somit anzunehmen, dass die Expression von Derlin-1 mit einer malignen Progression bzw. einer Metastasierung auch in caninen Mammatumoren assoziiert sein könnte (Klopfleisch and Gruber 2008). Daten zur Untersuchung der Proteinexpression von Derlin-1 in Gesäugetumoren des Hundes liegen derzeit nicht vor.

#### 2.4 Transforming Growth Factor-β (TGF-β)

#### 2.4.1 TGF-β-Proteinstruktur und Funktion

In Säugetieren unterscheidet man die TGF- $\beta$ -Isoformen 1 bis 3, die initial alle als *Precurser*-Proteine in der Zelle synthetisiert werden (Roberts 1998). Sie sind in hohem Maße sequenzhomolog und überlappen in ihrer Funktion (Pelton et al. 1991; Roberts 1998). Die Isoformen weisen die gleiche Grundstruktur auf, bestehend aus einer reifen, biologisch aktiven C-terminalen, einer variablen Pro- und einer N-terminalen Signal-Domäne, dem TGF- $\beta$  *Latency-associated protein* (LAP) (Roberts 1998). In dieser Form, als sogenannter *Small latent complex* (SLC) oder mit einer zusätzlichen Bindung des *Latent TGF-\beta binding proteins* (LTBP), als *Large latent complex* (LLC), wird TGF- $\beta$  sezerniert und in inaktiver Form in der extrazellulären Matrix (EZM) sequestriert (Roberts 1998). Biologisch aktives TGF- $\beta$  entsteht nach Abspaltung von LTBP (Pelton et al. 1991). LTBP spielt somit eine wichtige Rolle als Modulator der TGF- $\beta$ -Bioverfügbarkeit (siehe 2.6.1).

Zu den auto- und parakrinen Effekten von TGF- $\beta$  gehören die Regulation der Zelldifferenzierung, -proliferation und -adhäsion sowie die Einleitung der Apoptose und der Aufbau der EZM. Die TGF- $\beta$ -Isoformen binden dabei an die auf vielen Zellarten vorkommenden TGF- $\beta$ -Rezeptoren vom Typ 1 und 2 (T $\beta$ R 1 und T $\beta$ R 2). Nach der Bindung

an den T $\beta$ R 1 und 2 kommt es zur transkriptionellen Regulation verschiedener Effektorgene (Kim et al. 2005; Siegel and Massague 2003).

TGF- $\beta$  wirkt auf die Zellen der verschiedenen Keimblätter in unterschiedlicher Weise. So ist der Einfluss auf Epithelgewebe und lymphoide Zellen überwiegend antiproliferativ, wobei mesenchymale Zellen, insbesondere die Zellen, die für die Produktion von EZM verantwortlich sind, einen vornehmlich mitogenen Effekt erfahren (Hartsough and Mulder 1997; Sporn and Roberts 1992). Hervorgerufen wird der Einfluss auf die Zellproliferation u.a. über die transkriptionelle Regulation der CDKI p15 (Hannon and Beach 1994), p21 (Datto et al. 1995) und p27 (Hengst et al. 1994; Koff et al. 1993; Polyak et al. 1994; Slingerland et al. 1994). An den Phasen der Entwicklung und Involution der Brustdrüse, mit Ausnahme der Laktation, sind alle drei Isoformen beteiligt (Robinson et al. 1991). Sie nehmen dabei eine wichtige Rolle in der Regulation der Morphogenese und der funktionellen Differenzierung ein. Bei der Rückbildung von Drüsengewebe nach der Laktation übernimmt TGF- $\beta$ entscheidende Funktionen bei der Steuerung des programmierten Zelltods sowie dem Prozess der Matrixumgestaltung. Der Wachstums-regulierende TGF- $\beta$  wird dabei sowohl vom Epithel als auch vom Stroma exprimiert (Serra and Crowley 2003).

#### 2.4.2 TGF-β-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe

Im Rahmen der Karzinogenese unterschiedlicher Tumore konnte in verschiedenen Studien eine duale Rolle von TGF-β sowohl als Tumorsuppressor als auch als Promoter festgestellt werden (Hartsough and Mulder 1997). Am Beispiel von humanen Mammatumoren ist eine wachstumsinhibierende Funktion vor allem in den frühen Brustkrebsstadien festzustellen, die während der Tumorprogression häufig verloren geht und somit zu einer ungehinderten Zellproliferation führt (Benson 2004; de Caestecker et al. 2000). In immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte TGF-β-Expression in malignen humanen Mammagewebe und eine positive Korrelation der TGF-β-Expression mit dem Tumorgrad festgestellt werden (Derynck et al. 2001; Dublin et al. 1993; Koli and Arteaga 1996; McCune et al. 1992; Mizukami et al. 1990; Walker and Dearing 1992).

Mögliche Ursachen für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber den antiproliferativen Effekten von TGF- $\beta$  werden in der Literatur vielfältig diskutiert. Dabei stellen Mutationen im Bereich des TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweges, wie sie häufig im Rahmen der Karzinogenese gastrointestinaler Neoplasien beschrieben werden (Markowitz et al. 1995; Park et al. 1994), bei Adenokarzinomen der Milchdrüse ein nur sehr seltenes Phänomen dar (Riggins et al.

1997; Wakefield et al. 2001). Eine mögliche Ursache könnte die Epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) von Mammatumorzellen sein. Im Rahmen dieser Transdifferenzierung verlieren die Tumorzellen ihren epithelialen Charakter und werden fibroblastoid (Kim et al. 2005; Welch et al. 1990). TGF- $\beta$  könnte in dieser Phase auf Tumorzellen einen überwiegend mitogenen Effekt haben, ähnlich wie für nicht neoplastische, mesenchymale Zellen.

Des Weiteren wirkt TGF- $\beta$  über einen indirekten Mechanismus als Tumorpromoter, indem durch Einflüsse auf das umliegende Stroma die Förderung der Angiogenese sowie durch immunsuppressive Eigenschaften optimale Bedingungen für ein ungehindertes Tumorwachstum geschaffen werden (Derynck et al. 2001; Kim et al. 2005; Massague 1990; Pertovaara et al. 1994).

Untersuchungen zur Proteinexpression von TGF- $\beta$  in caninen Mammatumoren liegen derzeit nicht vor. Erste Untersuchungen konnten jedoch ein signifikant verringertes TGF- $\beta$ 3-mRNA-Expressionsniveau in laser-mikro-dissezierten Gewebeproben maligner caniner Mammatumore nachweisen. Für die Expressionsprofile der Isoformen 1 und 2 fanden sich in normalen caninen Milchdrüsen, Adenomen, Karzinomen und Lymphknotenmetastasen keine signifikanten Unterschiede (Klopfleisch et al. 2009).

### 2.5 Latent TGF-β binding protein (LTBP)

#### 2.5.1 LTBP-Proteinstruktur und Funktion

LTBP ist ein zwischen 125 und 250 kDa schweres Glykoprotein, das zur Fibrillin-LTBP-Familie gehört (Koli et al. 2001). Beim Säugetier wurden bislang vier verschiedene Isoformen nachgewiesen (Giltay et al. 1997).

Die LTBP-Isoformen zeichnen sich durch eine duale Funktion aus. Eine wichtige Rolle wird im Rahmen der intrazellulären Prozessierung von TGF- $\beta$  übernommen (Mangasser-Stephan and Gressner 1999). LTBP agiert dabei als Chaperon, zur Sicherung der korrekten Proteinfaltung von TGF- $\beta$  (Rifkin 2005). Die synthetisierten TGF- $\beta$ -Moleküle werden mit einer Bindung an LTBP als LLC aus der Zelle transportiert und in der EZM deponiert, um bei Bedarf schnell zur Verfügung zu stehen (Derynck et al. 2001; Mangasser-Stephan and Gressner 1999; Miyazono et al. 1991; Miyazono et al. 1992). In Abwesenheit von LTBP wird TGF-β nur sehr langsam und ineffizient sezerniert und der überwiegende Teil verbleibt intrazellulär (Mangasser-Stephan and Gressner 1999; Miyazono et al. 1991).

Verschiedene Studien zeigten, dass LTBP zu ca. 90% frei von TGF- $\beta$  vorliegt (Miyazono et al. 1991; Roberts 1998; Taipale et al. 1994). Anhand dieser Untersuchungen wurde deutlich, dass LTBP mehr als nur TGF- $\beta$ -bindende Funktionen übernimmt. Die zweite wichtige Funktion erfüllt LTBP als strukturelle Komponente in der EZM (Koli et al. 2001). Dabei konnten Interaktionen mit einer Fülle von Matrixproteinen, darunter Kollagen, Fibronectin und elastischen Fasern, festgestellt werden (Sterner-Kock et al. 2002; Taipale et al. 1996).

#### 2.5.2 LTBP-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe

Die LTBP-Isoformen werden in nahezu allen Geweben exprimiert, obgleich für LTBP-4 eine gewebespezifische erhöhte Expression in Aorta, Herz, Dünndarm und Ovarien festgestellt werden konnte (Giltay et al. 1997; Saharinen et al. 1998).

Die Bedeutung von LTBP im Rahmen der Karzinogenese ist weitestgehend ungeklärt. Bekannt ist jedoch, dass neoplastisch veränderte Zellen in späteren Stadien der malignen Transformation eine erhöhte TGF-B-Produktion aufweisen, jedoch nicht oder nur unzureichend dazu in der Lage sind dieses zu sezernieren. Bei Untersuchungen hinsichtlich des Expressionsmusters von LTBP in humanen Tumoren wurde eine generell verminderte Expression im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt (Eklov et al. 1993; Henriksen et al. 1995; Mauel et al. 2007; Mizoi et al. 1993; Roth-Eichhorn et al. 2001; Sterner-Kock et al. 2002). Somit kann vermutet werden, dass die verminderte Bioverfügbarkeit von TGF-β in einer Minderproduktion von LTBP begründet liegen könnte (Eklov et al. 1993; Mizoi et al. 1993). Untersuchungen zum LTBP-Expressionsmuster in Mammatumoren liegen derzeit nur begrenzt vor. Bei der bisher einzigen Studie an humanen Brusttumoren konnte eine verringerte LTBP-Expression in malignen Tumoren nachgewiesen werden (Mauel et al. 2007). Eine Korrelation zwischen verminderter LTBP-Expression und Tumorgrad bzw. Metastasierungspotential konnte nicht festgestellt werden. Ob die verminderte Expression als Auslöser einer Zelltransformation oder aber als Reaktion einer bereits neoplastisch veränderten Zelle angesehen werden kann, bleibt jedoch offen.

Die Hypothese, dass LTBP an der Karzinogenese epithelialer Strukturen beteiligt sein könnte, wird zum Teil durch die Untersuchung von LTBP-4-Knockout-Mäusen bestätigt, die neben Lungenemphysemen und Kardiomyopathien zusätzlich colorektale Adenokarzinome entwickelten. Weiterhin zeigten LTBP-4-Knockout-Mäuse Defekte in der elastischen Faserstruktur, die eine Zellinvasion und Metastasierung eventuell begünstigen (Sterner-Kock et al. 2002).

Zur Untersuchung des Expressionsprofils von LTBP in caninen Mammatumoren liegen derzeit nur Ergebnisse auf transkriptioneller Ebene vor. Diese zeigen, dass Adenokarzinome im Vergleich zum Normalgewebe und zu den untersuchten Adenomen verringerte LTBP-4-mRNA-Level aufweisen (Klopfleisch et al. 2009 ). Daten zur Untersuchung der Proteinexpression von LTBP-4 in caninen Mammatumoren liegen derzeit nicht vor.

#### 2.6 Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1B (p27)

#### 2.6.1 p27-Proteinstruktur und Funktion

Die Progression des Zellzyklus wird von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKI) streng reguliert. Diese können Cycline binden, inaktivieren und dadurch den Zellzyklus blockieren (Sherr and Roberts 1999; Viglietto et al. 2002). Die CDKI werden nach ihrer Wirkungsweise in zwei Gruppen eingeteilt. Die Proteine der *Kinase inhibitors* (INK4) p15, p16, p18 und p19 binden spezifisch an die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 und verhindern somit die Cyclin D-Interaktion. Im Gegensatz dazu können p21, p27 und p57 als Mitglieder der Kinase-inhibierenden Proteine (KIP) verschiedene Cyclin-gebundene CDK-Komplexe binden und inhibieren (Chiarle et al. 2001).

p27 ist ein 27 kDa schweres Protein, das ursprünglich in proliferationsinaktiven Zellen entdeckt wurde, hervorgerufen durch einen TGF-β induzierten Zellzyklusarrest (Hengst et al. 1994; Koff et al. 1993; Polyak et al. 1994; Slingerland et al. 1994). p27 hemmt vor allem die Funktion des Cyclin E/CDK2-Komplexes (Slingerland and Pagano 2000). Eine Rolle bei der Aktivierung des Cyclin D/CDK-Komplexes wurde ebenfalls beschrieben (Chiarle et al. 2001). p27 wirkt vor allem in der G0- und der frühen G1-Phase und verhindert den Eintritt in die S-Phase und somit den Fortschritt des Zellzyklus. Verschiedene Mechanismen sind bekannt, die den Proliferations-inhibierenden Effekt von p27 aufheben. So konnte in verschiedenen Studien festgestellt werden, dass es zu keiner Veränderung des p27-mRNA-, wohl aber des Proteinexpressionsniveaus während des Zellzyklus kommt (Pagano et al. 1995; Shirane et al. 1999). Mechanismen, die eine verminderte p27-Proteinexpression bedingen können, sind der verstärkte proteolytische Abbau, die Sequestration mit Hilfe von Cyclin D/CDK und ein

Funktionsverlust durch Misslokalisation vom Zellkern ins Zytoplasma (Alkarain and Slingerland 2004).

Pagano et al. entdeckten ein vermindertes p27-Proteinexpressionsniveau während des Übergangs von der G0- in die S-Phase, bedingt durch eine im Vergleich zu nicht proliferativen Zellen bis zu achtfachen Verkürzung der Halbwertszeit (Pagano et al. 1995). Vermittelt wird der proteolytische Abbau dabei über das Ubiquitin-Proteasom-System (Pagano et al. 1995; Shirane et al. 1999). Polyak et al. hingegen beobachteten, dass p27 in proliferierenden Zellen durchaus vorhanden, jedoch in funktionell inaktiver Form an Cyclin D/CDK4-Komplexe gebunden ist (Polyak et al. 1994). Durch die Sequestration des Proteins wird der inhibierende Einfluss auf verschiedene Cyclin-Komplexe, insbesondere Cyclin E/CDK2, unterbrochen und der vorangegangene Zellzyklusarrest kann aufgehoben werden (Sherr and Roberts 1999).

Positiv beeinflusst wird die Proteinexpression von p27 wie eingangs erwähnt von TGF- $\beta$  (Chiarle et al. 2001; Hengst et al. 1994; Polyak et al. 1994; Slingerland and Pagano 2000). Dabei induziert TGF- $\beta$  neben der Expression von p27 die p15-Expression, welches CDK 4/6-Komplex-gebundenes p27 löst und somit die Inhibition des Cyclin E/CDK2-Komplexes ermöglicht (Polyak et al. 1994; Reynisdottir et al. 1995). Bei Verlust von TGF- $\beta$  sinkt das p27-Proteinlevel erheblich (Liu et al. 2000).

#### 2.6.2 p27-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe

p27 kommt in einer Vielzahl von Zellarten vor. Innerhalb von Epithelien gibt es jedoch Schwankungen in der Intensität der nukleären p27-Expression zwischen den verschiedenen Zellschichten. So findet man vor allem in gut differenzierten terminalen Epithelschichten ein starkes Kernsignal, das in Richtung proliferationsaktiver Basalschicht deutlich abnimmt (Erlanson et al. 1998; Jordan et al. 1998).

Zahlreiche Studien haben die Proteinexpression von p27 in verschiedenen Tumoren untersucht und kamen überwiegend zu dem Ergebnis, dass verschiedene maligne Tumore, u.a. Adenokarzinome der Lunge oder der Brust und lymphoproliferative Neoplasien, häufig einen Verlust oder eine verminderte Proteinexpression von p27 zeigten (Slingerland and Pagano 2000). Eine Tumor-assoziierte Mutation des Gens konnte dabei nur sehr selten bei humanen Mammatumoren festgestellt werden (Spirin et al. 1996). Es erscheint somit möglich, dass p27, obgleich es nicht die klassischen Paradigmen an ein Tumorsupressorgen erfüllt, als

Tumorsupressorprotein an der Tumorgenese beteiligt sein könnte (Blain and Massague 2002; Slingerland and Pagano 2000).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein reduziertes p27-Expressionsniveau ein unabhängiger prognostischer Faktor für viele Tumorarten ist. So hatten Lungenkarzinome mit verminderter p27-Expression eine verringerte Überlebenszeit (Esposito et al. 1997). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Loda et al., die ein reduziertes p27-Expressionsniveau mit einem 2,4 bis 2,7 fach erhöhtem Sterberisiko bei Patienten mit Colonkarzinomen feststellten (Loda et al. 1997). In Brusttumoren mit einem Durchmesser von weniger als 1 cm untersuchten Tan et al. mittels immunhistochemischer Verfahren die p27-Proteinexpressionslevel und konnten zeigen, dass eine verminderte Expression (weniger als 50% der Zellkerne positiv) einen unabhängigen Risikofaktor in der Multivarianzanalyse darstellte, der mit einer 3,4fach erhöhten Sterberate assoziiert war (Tan et al. 1997). Catzavelos et al. zeigten in 56% der von ihnen untersuchten Brusttumore eine verminderte p27-Expression. Der Proteinverlust stellt dabei einen unabhängigen prognostischen Faktor hinsichtlich der krankheitsfreien Überlebenszeit und einem damit verbunden 2,7fach erhöhtem Rezidivrisiko dar (Catzavelos et al. 1997). Genannte Studien lassen den Einsatz von p27 als prognostischer Tumormarker diskutieren, wenn z.B. andere sonst gewählte prognostische Parameter allein nicht ausreichend prediktiv sind (Chiarle et al. 2001; Slingerland and Pagano 2000).

Als mögliche Ursachen des gehäuft auftretenden Verlustes bzw. der Reduktion der nukleären p27-Expression in malignen Tumoren sind die eingangs erwähnten Mechanismen zu diskutieren, die in nicht neoplastisch verändertem Gewebe zu einer Senkung des Proteinspiegels führen. So wurde funktionell inaktives zytoplasmatisches p27-Protein z.B. in bösartigen Tumoren von Prostata, Ovar und Ösophagus beschrieben (Guo et al. 1997; Masciullo et al. 1999; Singh et al. 1998). Auch in über 40% der malignen Mammatumore konnte eine derartige Misslokalisation durch verschiedene Autoren bestätigt werden (Blain and Massague 2002; Liang et al. 2002; Shin et al. 2002). Dabei wurde in zwei Studien eine positive Korrelation zwischen zytoplasmatischer p27-Expression und Tumoraggressivität und einer schlechteren Prognose festgestellt (Blain and Massague 2002; Liang et al. 2002). Slingerland and Pagano 2000). Andere Autoren wiederum machen einen verstärkten proteolytischen Abbau für das reduzierte p27-Expressionslevel in Tumoren verantwortlich (Slingerland and Pagano 2000).

Die Expression von p27 in Neoplasien des Hundes wurde bislang nur in wenigen Studien untersucht. So zeigten Inoue et al. mittels immunhistochemischer Verfahren, dass in malignen

caninen Hauttumoren p27 im Vergleich zu den gutartigen Veränderungen vermindert exprimiert wird (Inoue et al. 2006). In einer Studie zur Untersuchung von kutanen Mastzelltumoren und Histiozytomen wurde der Verlust der Expression von p27 als ein möglicher frühzeitiger Schritt bei der Tumorentstehung diskutiert (Wu et al. 2004). Weiterhin konnte in laser-mikro-dissezierten caninen Mammatumoren eine verminderte mRNA-Expression in nahezu allen Karzinomen und dazugehörigen Lymphknotenmetastasen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu waren nur 40% der Adenome durch eine Reduktion der p27-Expression gekennzeichnet (Klopfleisch and Gruber 2009a).

#### 2.7 RAD51

#### 2.7.1 RAD51-Proteinstruktur und Funktion

RAD51 ist ein 37 kDa schweres Protein. Es ist ein wichtiger Bestandteil des DNA-Reparatursystems und sichert die genomische Integrität der Zelle. Werden durch die Sensoren der Reparatursysteme fehlerhafte Stellen im Genom der Zelle wahrgenommen, kommt es zum Zyklusarrest und die DNA-Reparaturmechanismen werden aktiviert. RAD51 nimmt dabei eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination ein (Johnson and Jasin 2000). Während der homologen Rekombination werden initial die Bruchenden mit Hilfe von Endonukleasen gekürzt, so dass freie einzelsträngige DNA (ssDNA) für eine anschließende Basenpaarung zur Verfügung steht. RAD51 bildet darauffolgend unter Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) helikale Nukleoproteinfilamente auf der ssDNA aus (Benson et al. 1994). Der entstandene Filamentkomplex interagiert im nächsten Schritt mit dem Schwesterchromatid bzw. homologen Chromosom und sucht dieses nach äquivalenten Sequenzen ab. Ist der Vorgang erfolgreich, wird die DNA-Doppelhelix entwunden und es erfolgt eine Invasion des RAD51gebundenen Einzelstranges (Benson et al. 1994). Dieser lagert sich an komplementäre Sequenzen an und verdrängt damit den vorhandenen intakten Strang. Die freien Enden können nun über eine Polymerase verlängert und der DNA-Schaden behoben werden. Bei Funktionsverlust von RAD51 kommt es zum gehäuften Auftreten von DNA-Schäden, die in einer gestörten Zellfunktion, der Apoptose, oder einer gesteigerten Mutationsrate resultieren können (Bertrand et al. 2003; Henning and Sturzbecher 2003).

#### 2.7.2 RAD51-Expression in nicht neoplastischem und neoplastischem Gewebe

RAD51 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein mit verstärkter Expression in lymphatischen und meiotischen Geweben. Es handelt sich bei erstgenannten vor allem um Organe wie Lymphknoten, Milz und Darm, die einen hohen lymphozytären Anteil mit entsprechend hoher Proliferationsaktivität aufweisen (Shinohara et al. 1993). RAD51 ist ein nukleäres Protein, das zunächst diffus im Zellkern verteilt und nach Auftreten von DNA-Schäden multifokal als intranukleäre Foci nachweisbar ist (Raderschall et al. 2002). Reguliert wird die Expression von RAD51 über verschiedene Proteine, darunter p53, BRCA1/2 sowie TGF-β (Arias-Lopez et al. 2006; Kanamoto et al. 2002; Linke et al. 2003; Venkitaraman 2002).

Hinsichtlich der mRNA-Expression bzw. des Proteinlevels für RAD51 in neoplastischem Gewebe sind zahlreiche Untersuchungen vorgenommen worden mit teils kontroversen Ergebnissen. In einigen Studien konnte mit Hilfe immunhistochemischer Methoden eine RAD51-Überexpression festgestellt werden, die im Fall von Maacke et al. mit dem histologischen Grad von Brusttumoren eine positive Korrelation aufwiesen. Aufgrund der ermittelten Daten wurde der Einsatz von RAD51 als prognostischer und diagnostischer Marker in der Humanmedizin für Brustkrebspatienten diskutiert (Maacke et al. 2000a; Maacke et al. 2000b). Des Weiteren konnten eine erhöhte Expression in 66% der Fälle in Adenokarzinomen des humanen Pankreas und eine positive Korrelation zwischen erhöhter RAD51-Expression und einer verkürzten Überlebenszeit in Lungenkarzinomen festgestellt werden (Maacke et al. 2000a; Qiao et al. 2005). An isolierten Tumorzelllinien untersuchten Raderschall et al. den RAD51-Proteingehalt und konnten eine zwei- bis siebenfach erhöhte Expression gegenüber nicht malignen Zelllinien zeigen (Raderschall et al. 2002).

Die Frage, ob die Überexpression ein sekundäres Phänomen darstellt oder ob möglicherweise ein direkter Zusammenhang zur initialen Tumorprogression besteht, bleibt bei allen diesen Studien offen. So postulierten Richardson et al., dass erhöhte RAD51-Proteinlevel eine Zunahme der Rekombination bewirken, die wiederum eine genomische Instabilität und somit eine mögliche Tumorprogression nach sich zieht (Richardson et al. 2004).

Andererseits zeigten Tumore mit einer erhöhten RAD51-Expression einen Anstieg an Resistenzen gegenüber DSB-induzierender Zytostatika und ionisierender Strahlen sowie den Hinweis auf eine Apoptosetoleranz (Vispe et al. 1998). Es wurde deshalb spekuliert, dass RAD51 nicht als initialer Schritt an der Karzinogenese beteiligt sein könnte, sondern aufgrund der Resistenzentwicklung gegenüber Bestrahlung und einigen Chemotherapeutika sekundär zur malignen Entartung beiträgt.

Zu kontroversen Ergebnissen kamen Yoshikawa et al., die eine bis zu 30% reduzierte Expression von RAD51 in humanen Mammatumoren im Vergleich zum Normalgewebe feststellten (Yoshikawa et al. 2000). In einer Studie aus Schweden, bei der ebenfalls immunhistochemische Untersuchungen an humanen Mammatumoren durchgeführt wurden, stellte man eine reduzierte Expression des BRCA1/BRCA2/RAD51-Komplexes fest. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen verminderter Expression und histologischem Grad (Soderlund et al. 2007).

Ein direkt karzinogener Effekt bedingt durch Mutationen im RAD51-Genlokus konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Lose et al. 2006; Thacker 2005).

Untersuchungen des RAD51-mRNA-Expressionsniveaus in caninen Mammatumoren zeigten eine bis zu vierfach erhöhte Expression bei der Hälfte der Adenokarzinome und bei ca. 80% der dazugehörigen Lymphknotenmetastasen. In der Gruppe der Adenome waren in 40% der Fälle die Expressionslevel vermindert (Klopfleisch and Gruber 2009b). Daten zur Untersuchung der Proteinexpression von RAD51 in caninen Mammatumoren liegen derzeit nicht vor.

# **3** Arbeitshypothese und Versuchsplanung

Wie bereits aus dem Kapitel 2.2.4 ersichtlich wurde, sind die molekularen Mechanismen der Entstehung caniner Mammatumore nur fragmentarisch bekannt. Basierend auf bisherigen Studien zur transkriptionellen Dysregulation von Derlin-1, TGF- $\beta$ , LTBP-4, p27 und RAD51 in caninen Mammatumoren und den Beobachtungen in humanen Milchdrüsentumoren wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die fünf Proteine Malignitäts-assoziierte Veränderungen ihres Expressionsmuster in caninen Mammatumoren zeigen.

Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, sollten in der vorliegenden Arbeit die Proteinexpressionen von Derlin-1, TGF- $\beta$ , LTBP-4, p27 und RAD51 mittels immunhistochemischer Verfahren untersucht werden. Dabei sollten Adenome, Adenokarzinome, ihre dazugehörigen Lymphknotenmetastasen sowie jeweils korrespondierendes normales Milchdrüsengewebe auf ihren jeweiligen spezifischen Proteingehalt untersucht werden. Der Vergleich der Expressionsunterschiede innerhalb der Gewebegruppen sollte aufzeigen, ob sich das Expressionsniveau der Proteine in verschiedenen Stadien der malignen Progression von caninen Mammatumoren ändert.

# 4 Material und Methoden

#### 4.1 Patientenkollektiv-Probenmaterial

Für die Untersuchung stand formalinfixiertes und paraffineingebettetes Tumormaterial aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Freien Universität Berlin zur Verfügung. Dabei wurden Proben aus dem Zeitraum von 2000 bis 2008 verwendet. Insgesamt 97 Mammatumorproben und dazugehöriges normales Milchdrüsengewebe von Hunden unterschiedlicher Rassen wurden in die Studie aufgenommen.

#### 4.2 Aufbereitung der Gewebeproben und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Das verwendete Probenmaterial wurde über Nacht in 4%igem Formalin (Fa. SAV Liquid Production, Deutschland) fixiert, in einem Automatensystem (Tissue-Tec V.I.P. 5, Fa. Vogel, Deutschland) nach einem standardisierten Laborprotokoll entwässert und im Anschluss per Hand in Paraffin (Fa. Engelbrecht, Deutschland) eingebettet. Von den entstandenen Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Fa. Jung AG, Heidelberg) 2 bis 4 µm dünne Schnitte angefertigt und diese auf unbeschichtete Objektträger (Super Frost, Fa. Langenbrinck, Deutschland) aufgezogen. Gefärbt wurden die Schnitte routinemäßig in einem Färbeautomaten (Auto Stainer XL, Fa. Leica, Deutschland) mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gemäß dem im Anhang aufgeführten Färbeprotokoll (Anhang 12.2). Das Eindecken erfolgte automatisch in einem Eindeckautomat (CV5030, Fa. Leica, Deutschland) mit einem xylolhaltigen Eindeckmittel.

#### 4.3 Histopathologische Klassifikation

Die histopathologische Klassifikation der Tumore erfolgte anhand der angefertigten HE-Schnitte nach gültigen WHO-Richtlinien für die Klassifikation caniner Mammatumore (Misdorp et al. 1999) (Abb.1).

Für die fotografische Dokumentation der HE-Schnitte stand ein Lichtmikroskop mit integrierter Digitalkamera (Olympus BX 41, Color View H Kamera Set) zur Verfügung. Bei der verwendeten Software handelt es sich um analySIS<sup>®</sup>Doku (Soft Imaging System).

#### 4.4 Immunhistochemische Untersuchung

In die immunhistochemische Untersuchung gingen alle zuvor als einfache Adenome (AD) und einfache Adenokarzinome (AK) mit dazugehörigen Lymphknotenmetastasen (LKM) klassifizierte Tumorgewebe ein. Diese wurden mit dem jeweils korrespondierenden normalen Milchdrüsengewebe auf ihr Proteinexpressionsniveau untersucht. Dabei wurde die Reaktivität der humanen Antikörper Derlin-1, TGF- $\beta$ , LTBP-4, p27 und RAD51 in den ausgewählten Gewebeschnitten für benigne und maligne Tumore getrennt beurteilt. Im Nachfolgenden werden die beiden Gruppen als Stichprobe 1 (AD + korrespondierendes NG) und Stichprobe 2 (AK + korrespondierendes NG + LKM) bezeichnet.

#### 4.4.1 Aufbereitung der Proben

Von den bereits vorhandenen Paraffinblöcken erfolgte die Herstellung von 2 µm dünnen Schnitten auf einem Rotationsmikrotom (HM 325, Fa. Microm GmbH, Deutschland), die zum Strecken in ein 40°C warmes Wasserbad (Paraffinstreckbad, Fa. Medax Nagel GmbH, Deutschland) überführt wurden. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte auf beschichtete Objektträger (Starfrost, Fa. Langenbrinck, Deutschland) gezogen und über Nacht in einem Wärmeschrank (Typ A, Fa. Melag, Deutschland) bei 37°C getrocknet. Für eine bessere Gewebehaftung am Objektträger erfolgte am Folgetag eine zweistündige Lagerung in einem Thermostat (Typ A, Fa. Melag, Deutschland) bei 60°C. Nach anschließender Abkühlung wurden alle für die immunhistochemische Untersuchung benötigten Schnitte nach dem im Anhang aufgeführten Protokoll in Xylol entparaffinisiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydratisiert (Anhang 12.3).

#### 4.4.2 Immunhistochemische Färbung

Die für die vorliegende Arbeit verwendete immunhistochemische Färbemethode entspricht der sogenannten *Avidin-Biotin-Complex-*(ABC-)Methode. Dabei lagert sich der Primärantikörper an das entsprechende Antigen an und wird im nächsten Schritt von einem biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Nach anschließender Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex (Enzym: Meerrettich-Peroxidase) und dessen hochaffine Anlagerung an das Biotinmolekül des Sekundärantikörpers erfolgt die Zugabe des Chromogens 3.3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Zusammen mit  $H_2O_2$  und der

katalytischen Wirkung der Peroxidase wird DAB schnell in eine farbige Substanz umgesetzt und macht somit das Antigen für lichtmikroskopische Untersuchungen sichtbar.

Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate zuvor für 30 Minuten (min) in Methanol mit Zusatz von 30% igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fa. Merck, Deutschland) gelagert. Im Anschluss erfolgte eine biphasische Spülung zuerst in Aqua dest. und darauffolgend in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *Phosphate buffered saline*, PBS; pH 7,4, Anhang 12.3).

Für die mitunter erforderliche Proteindemaskierung wurden die Schnitte je nach verwendetem Primärantikörper zwei verschiedenen Vorbehandlungsmethoden unterzogen (Tabelle 1). Dabei erfolgte die Antigendemaskierung für die Antikörper Derlin-1 und p27 in einer 10 mM Citratpufferlösung (pH 6,0) mit Zusatz von 350 µl Triton-X (Triton-X-100, Fa. Sigma, USA) und 675 ml Aqua dest., die zuvor 15 min in einer 500 Watt Mikrowelle (Sharp) erhitzt wurde. Der Zusatz von Triton-X diente dabei der verbesserten Gewebepermeabilität. Im Anschluss erfolgte die Mikrowellenbehandlung der Schnitte bei 500 Watt für 12 min. Nach 15-minütiger Abkühlung wurden die Gewebeschnitte in PBS-Puffer überführt. Bei Verwendung der Antikörper TGF-β und RAD51 wurde die Demaskierung der Antigene mittels Inkubation in vorgewärmter Protease (AppliChem, Biochemica)/PBS-Lösung für 15 min bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss folgte die Überführung in PBS-Puffer. Für den Primärantikörper LTBP-4 war keine Vorbehandlung erforderlich.

Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer nach vorangegangener Blockierung unspezifischer Reaktionen mittels Ziegennormalserum in PBS mit Zusatz von 2% bovinen Serumalbumin (Fa. Sigma-Aldrich) (PBS/BSA 2%) in einem Verhältnis von 1:4 für 30 min bei Raumtemperatur.

#### 4.4.2.1 Verwendete Primärantikörper

Bei den Primärantikörpern handelt es sich um mono- und polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen, die ursprünglich für den Einsatz am menschlichen Gewebe etabliert wurden. Um die Reaktivität am caninen Gewebe zu testen und eine optimale Verdünnung zu ermitteln, wurden zu Beginn immunhistochemische Voruntersuchungen durchgeführt. Die Aufbewahrung der kommerziell erhältlichen Antikörper erfolgte nach Angaben des Herstellers entweder bei 4°C oder -20°C (Tabelle 1). Alle Primärantikörper wurden in PBS/BSA 2% bis zur jeweiligen Gebrauchskonzentration verdünnt.

Die folgende Tabelle fasst die verwendeten Erstantikörper, deren Herkunft, Vorbehandlungen, Gebrauchskonzentrations- und Herstellerangaben sowie Lagerungshinweise zusammen.

Primär-	Herkunft	Vorbe-	Konzen-	Lagerung	Hersteller	Katalog-
antikörper		handlung	tration			Nr.
Derlin-1	rabbit	Mikrowelle	1:4000	-20°C	Sigma, Saint	D4443
					Louis,	
					Missouri, USA	
$TGF-\beta 3(V)$	p, rabbit	Protease	1:50	4°C	Santa Cruz	sc-82
(Nachweis					Biotechnoloy,	
von TGF-β					Inc., USA	
1 bis 3)						
LTBP-4	p, rabbit	-	1:20	4°C	Santa Cruz	sc-33144
					Biotechnoloy,	
					Inc., USA	
p27 (C-19)	p, rabbit	Mikrowelle	1:300	4°C	Santa Cruz	sc-528
					Biotechnoloy,	
					Inc., USA	
RAD51	p, rabbit	Protease	1:800	-20°C	Calbiochem,	PC130T
					USA	

p = polyclonal

Tabelle 1:Angaben zu den verwendeten Primärantikörpern (Herkunft, Vorbehandlung,Konzentration, Lagerungshinweise und Hersteller)

#### 4.4.2.2 Verwendete Sekundärantikörper

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde am Folgetag nach mehrmaligen Spülvorgängen mit PBS-Puffer für 30 min der Zweitantikörper, *Goat anti-rabbit IgG* (BA-1000, Fa. Vector, Burlingame, USA), in einem Verhältnis von 1:200 bei Raumtemperatur aufgebracht. Für die Herstellung der Verdünnungslösung wurde PBS mit Zusatz von Ziegennormalserum verwendet.
#### 4.4.2.3 ABC-Methode

Die lichtmikroskopische Darstellung der Antigene erfolgt mit Hilfe der ABC-Methode. Dazu wurde das ABC-Reagenz (Vectastain Elite ABC Kit, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) gemäß den Herstellerangaben angesetzt und nach 30 min Wartezeit auf die Objektträger aufgebracht. Nach einer halbstündigen Inkubation und anschließenden Spülvorgängen in Aqua dest. erfolgte die Zugabe der chromogenen DAB-Lösung. Durch Zugabe von  $H_2O_2$  (30%ig) kam es zur enzymatischen Farbreaktion, wobei für die einzelnen Antikörper verschiedene Färbezeiten für ein optimales lichtmikroskopisches Ergebnis ermittelt wurden (Tabelle 2).

		Derlin-1	TGF-β	LTBP-4	p27	RAD51
DAB- Färbung i min	n	6	4	3	4	7

Tabelle 2: DAB-Färbeprotokoll

Nach anschließenden mehrmaligen Spülvorgängen in Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyr (Fa. Merck GmbH, Darmstadt) für 20 Sekunden (s). Nachgeschaltete Waschvorgänge sowie das Bläuen der Präparate wurden in Leitungswasser durchgeführt. Nach 10-minütiger Wartezeit wurden die Gewebeschnitte nach dem im Anhang aufgeführten Protokoll in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie Xylol dehydratisiert (Anhang 12.3) und direkt im Anschluss mit einem xylolhaltigen Eindeckmittel automatisch eingedeckt (CV5030, Fa. Leica, Deutschland).

#### 4.4.3 Spezifitätskontrollen

Bei den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen wurden begleitend als Positivkontrolle histologische Präparate eines formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten Milchdrüsenkarzinomzelllinie (MCF7) mitgeführt. Zellpellets einer humanen Als Negativkontrolle wurden Schnitte caniner Mammatumore mit enthaltenem korrespondierenden NG nur mit dem Sekundär-, jedoch nicht mit dem Primärantikörper inkubiert und einer sonst identischen Färbeprozedur unterzogen.

#### 4.4.4 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung erfolgte an einem Balken-Binokular-Lichtmikroskop (Olympus BH-2) bei 400x Vergrößerung. Ausgenommen für die Analyse der Resultate von RAD51 und für fotographische Aufnahmen stand ein Lichtmikroskop mit integrierter Digitalkamera (Olympus BX 41, Color View H Kamera Set) zur Verfügung. Bei der verwendeten Software handelt es sich um analySIS<sup>®</sup>Doku (Soft Imaging System).

#### 4.4.4.1 Derlin-1

Zur Bestimmung der zytoplasmatischen Proteinexpression von Derlin-1 untersuchten zwei voneinander unabhängige Betrachter die immunhistochemisch gefärbten caninen Mammatumore. Dabei erfolgte eine semiquantitative Beurteilung der Färbeintensität von AD und dem jeweiligen korrespondierenden NG sowie AK mit dem korrespondierenden NG plus der dazugehörigen LKM und intravasale Tumorzellemboli (IVTZ) in jeweils zehn repräsentativen Gesichtsfeldern. Die Bewertungsskala setzte sich zusammen aus: keine Expression (0), geringgradige (ggrd.) Expression, mittelgradige (mgrd.) Expression und hochgradige (hgrd.) Expression.

#### 4.4.4.2 TGF-β, LTBP-4, p27

Für die Auswertung der Expression von TGF- $\beta$ , LTBP-4 und p27 nahmen zwei voneinander unabhängige Betrachter eine Bewertung der beiden Stichproben nach positivem (+) oder negativem (-) Antigengehalt vor. Dabei wurden pro Gewebegruppe jeweils zehn Gesichtsfelder evaluiert und Gewebe mit mehr als 10% immunhistochemisch reaktiven Zellen als positiv bewertet. Die zu beurteilenden Signale befanden sich dabei antikörperspezifisch im Zytoplasma oder im Nukleus (Tabelle 3).

#### 4.4.4.3 RAD51

Die nukleäre RAD51-Proteinexpression wurde in Stichprobe 1 und 2 in jeweils zehn Gesichtsfeldern à 400x Vergrößerung evaluiert, wobei pro Gewebe die Bewertung von mindestens 1000 Zellen erfolgte. Die Anzahl der negativen und positiven Zellkernsignale in Epithelzellen der Mamma wurden in allen Feldern festgestellt und im Anschluss der prozentuale Anteil positiver Zellen, gemessen an der Gesamtzellzahl, ermittelt.

	Derlin-1	TGF-β	LTBP-4	p27	RAD51
Lokalisation	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nukleär	nukleär

Tabelle 3: Antikörperspezifische Lokalisation der immunhistochemischen Reaktivität

#### 4.4.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der epidemiologischen Daten, die den Aufzeichnungen des Archivs des Institutes für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin entnommen wurden, erfolgte anhand einer deskriptiven Untersuchung der Häufigkeitsverteilungen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde abhängig von der zu untersuchenden Variable mit Hilfe eines Balkendiagrammes oder Boxplots vorgenommen. Dabei besteht ein Boxplot aus einer Box, die begrenzt wird vom ersten und dritten Quartil (25%- bzw. 75%-Perzentil) und deren innere Linie den Medianwert (50%-Perzentil) darstellt. Mit den Querstreifen ober- und unterhalb der Box wird der größte bzw. kleinste Wert der Stichprobe angegeben, die noch keine Ausreißer- oder Extremwerte sind. Ausreißerwerte sind Werte, die um mehr als das 1½- bis dreifache der Boxenhöhe außerhalb der mittleren 50% liegen. Sie sind gekennzeichnet durch einen Kreis. Extremwerte hingegen liegen um mehr als das dreifache außerhalb der Box und werden mit einem Stern markiert.

Bei der statistischen Analyse der Proteinexpression zwischen den Gewebegruppen erfolgte die Auswertung der Stichproben 1 und 2, sowie der Vergleich des Expressionsmusters der AD mit dem pathologisch veränderten Gewebe aus Stichprobe 2, jeweils paarweise. Um statistisch signifikante Unterschiede zu erkennen, wurde bei ordinal und metrisch skalierten Messdaten der Wilcoxon Rangsummentest, ein nichtparametrischer Test zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben, bzw. der Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben durchgeführt. Die Auswertung der nominal skalierten Ergebnisse erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson (x<sup>2</sup>-Test), einem Test zur Prüfung der Unabhängigkeit zweier Merkmale. Um Zusammenhänge der TGF-B-Expression mit der Proteinexpression von LTBP-4, p27 und RAD51 zu analysieren, wurden die neoplastischen Gewebegruppen separat mittels x<sup>2</sup>- und Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Bei signifikanten Ergebnissen wurde die zugrunde liegende Nullhypothese (H<sub>0</sub>), dass ein Expressionszusammenhang zwischen den untersuchten Variablen besteht, abgelehnt.

Das für alle Vergleiche zugrunde gelegte Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgesetzt (p<0,05). Alle Berechnungen sowie die graphischen Darstellungen wurden mit dem Programm SPSS, Version 12 für Windows, durchgeführt (Statistical packages for the social sciences, Firma SPSS Inc.).

## 5 Ergebnisse

#### 5.1 Lichtmikroskopische Untersuchung der HE-gefärbten Schnittpräparate

In die weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen gingen Tumore ein, die in der HE-Färbung als einfache AD oder einfache metastasierende AK mit dazugehörigen LKM nach gültigen WHO-Richtlinien für die Einteilung caniner Mammatumore klassifiziert wurden (Misdorp et al. 1999). Bei der Auswahl der Tumore wurde darauf geachtet, dass korrespondierendes neoplastisch unverändertes Gewebe desselben Tieres, und hier vorrangig im selben histologischen Präparat, vorhanden war.

Pathologisch nicht veränderte Milchdrüsen zeichneten sich durch ein regelmäßig angeordnetes, einschichtiges Epithel mit einer geringen Mitoserate aus, das je nach Laktationszeitpunkt als abgeflacht bis hochprismatisch in Erscheinung trat.

Die Gruppe der AD umfasste epitheliale Neoplasien mit guter Abgrenzbarkeit zum umliegenden Gewebe und gut differenziertem, ein- bis mehrschichtigem Epithel in tubulärer oder solider Formation. Anzeichen von infiltrativem Wachstum in das umliegende Gewebe oder Einbrüche von Tumorzellen in Lymph- oder Blutgefäße lagen nicht vor.

Einfache AK mit dazugehörigen LKM waren gekennzeichnet durch neoplastische Epithelzellen mit starker zellulärer Pleomorphie, Aniosokariose und einer hohen Mitoserate (> 4 Mitosen in einer 400x Vergrößerung). AK wiesen eine Infiltration in das umliegende Gewebe, teilweise Einbrüche in Lymph- und Blutgefäße und multifokale Nekrosebereiche auf. LKM zeigten ein Wachstum im Lymphknoten mit Verdrängung des lymphatischen Parenchyms. Mikrometastasen im Randsinus des Lymphknotens ohne Hinweise auf lokales Wachstum wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

Anhand der Auswertung der HE-Färbung gingen insgesamt 48 gut differenzierte einfache AD und 49 AK vom einfachen Typ mit den dazugehörigen LKM in die weiterführenden Untersuchungen ein.



Abbildung 2: (A) Unverändertes Milchdrüsengewebe, gekennzeichnet durch azinäre Anordnung von gut differenzierten, einheitlichen Epithelzellen. HE (Größenmaßstab = 300  $\mu$ m). (B) Einfaches Adenom, gekennzeichnet durch tubuläres Wachstum der mehrlagig angeordneten Tumorzellen, gute Abgrenzung zum umgebenden Bindegewebe und geringgradigen zellulären Pleomorphien. HE (Größenmaßstab = 300  $\mu$ m). (C) Einfaches Adenokarzinom. Die hochgradig pleomorphen neoplastischen Zellen sind in soliden Nestern ohne erkennbare tubuläre Differenzierung angeordnet. Weiterhin zeigten die Tumore eine hochgradige Anisokaryose und eine erhöhte Mitoserate. HE (Größenmaßstab = 300  $\mu$ m). (D) Lymphknotenmetastase. Neoplastische Zellen in Lymphknoten bilden solide Zellnester und primitive Azini und verdrängen Lymphknotengewebe. HE (Größenmaßstab = 270  $\mu$ m).

#### 5.2 Patientenkollektiv

Von den insgesamt 97 ausgewählten benignen und malignen caninen Mammatumoren konnten in einer Vielzahl der Fälle Angaben bezogen auf die Rasse und die Tumorlokalisation den archivierten Aufzeichnungen des Institutes für Veterinärpathologie entnommen werden. Zusätzliche epidemiologische Daten wie Geschlecht, Alter und Kastrationsstatus konnten nicht erhoben werden.

#### 5.2.1 Rasseverteilung

Bei insgesamt 74 Hunden konnten Angaben bzgl. der Rasse gemacht werden. Einschließlich der Mischlinge wurden 20 verschiedene Rassen ausgemacht, deren Verteilung in der Abbildung 6 anhand von absoluten Zahlen zu entnehmen ist. Die graphische Darstellung berücksichtigt dabei nur Rassen, die mehr als einmal vertreten waren. Die Gruppe der Terrier beinhaltete West Highland White-, Yorkshire-, Jack Russel und Cairn-Terrier. Bei den Retrievern wurden Golden Retriever und Retriever Labrador zusammengefasst. Hunderassen die hingegen nur einmal repräsentiert wurden, sind: Bayrischer Gebirgsschweißhund, Beagle, Chihuahua, Dalmatiner, Deutsch Kurzhaar, Dobermann, Eurasier, Französiche Bulldogge, Schnauzer und Saluki.



Abbildung 3: Graphische Darstellung der Hunderassen, die mit mehr als einem Tier vertreten waren.

#### 5.2.2 Tumorlokalisation

Für die Auswertung der Neoplasien hinsichtlich ihrer Lokalisation in den einzelnen MK gingen insgesamt 47 Hunde mit benignen und malignen Mammatumoren in die Untersuchung ein. Darunter waren 17 Patienten mit multiplen (Anzahl: 2-3) und 30 mit solitären Tumoren vertreten.

In 4 von 72 Fällen (5,6%) ist der MK1 im vorhandenen Untersuchungsgut mit der geringsten Erkrankungszahl vertreten. Gefolgt von den Komplexen 2 und 3, die in 13 Fällen (18,1%) respektive in 12 Fällen (16,7%) gleich stark betroffen waren. Bei den beiden kaudalen Gesäugekomplexen waren in 19 Fällen (26,4%) MK4 und in 24 Fällen (33,3%) MK5 betroffen. Diese Gruppe machte im Vergleich zu den übrigen Komplexen die höchste Tumorinzidenz aus. Die graphische Darstellung der Lokalisation caniner Mammatumore des Untersuchungsgutes kann dem Balkendiagramm aus Abbildung 7 entnommen werden.



Abbildung 4: Graphische Darstellung der Verteilung caniner Mammatumore in den Mammakomplexen (MK) 1 bis 5 in absoluten Zahlen. Insgesamt 47 Hunde, davon 17 mit multiplen (Anzahl 2-3) und 30 mit solitären Tumoren gingen in die Untersuchung ein.

#### 5.3 Lichtmikroskopische Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen

#### 5.3.1 Derlin-1

In die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung von Derlin-1 gingen insgesamt 44 AD und 49 AK mit dazugehörigen LKM sowie das jeweilige korrespondierende neoplastisch unveränderte Gewebe ein. Zusätzlich wurde in 40 der untersuchten 49 AK eine immunhistochemische Reaktivität der IVTZ beurteilt. Die Derlin-1 positiven Epithelzellen zeichneten sich durch eine unterschiedlich starke zytoplasmatische, rotbraune Färbung aus. Die Intensität des immunhistochemischen Signals wurde semiquantitativ als keine, geringgradige (ggrd.), mittelgradige (mgrd.) oder hochgradige (hgrd.) Proteinexpression bewertet.

Die Evaluierung ergab bei den 44 nicht-neoplastischen Milchdrüsengeweben aus Stichprobe 1 keine Expression in einem Fall (2,3%), eine ggrd. zytoplasmatische Derlin-1-Expression in 21 (47,7%) und eine mgrd. Expression in 22 Fällen (50%). Eine hgrd. Expression wurde nicht beobachtet. In der Gruppe der AD aus Stichprobe 1 zeigten 1/44 (2,3%) keine, 36/44 (81,8%) eine ggrd., 6/44 (13,6%) eine mgrd. und 1/44 (2,3%) eine hgrd. zytoplasmatische Expression. Bei der Beurteilung der 49 nicht-neoplastischen Milchdrüsengewebe aus Stichprobe 2 wurde keine Expression in 4 (8,2%), eine ggrd. Expression in 26 (53,1%) und eine mgrd. Derlin-1-Expression in 19 (38,8%) NG ermittelt. Eine hgrd. Expression konnte auch in dieser Gruppe nicht festgestellt werden. In AK fand sich im Vergleich dazu eine ggrd. Proteinexpression in 19 (38,8%), eine mgrd. Proteinexpression in 21 (42,9%) und ein hgrd. Expressionslevel in 9 von 49 Fällen (18,4%). Eine ggrd. Derlin-1-Expression konnte in 7 (14,3%), eine mgrd. Expression in 27 (55,1%) und eine hgrd. Expression in 15 (30,6%) der insgesamt 49 immunhistochemisch gefärbten LKM festgestellt werden. Die zusätzlich untersuchten IVTZ wiesen eine mgrd. Proteinexpression in 4 (10%) und eine hgrd. Expression in 36 (90%) von 40 Fällen auf. Die positive immunhistochemische Reaktivität der einzelnen Gruppen erstreckte sich dabei relativ homogen über den gesamten Gewebeschnitt. Eine unspezifische Färbereaktion der untersuchten Gewebe wurde in keinem der Fälle beobachtet. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in der Abbildung 8 graphisch dargestellt. Endothelzellen und Fibroblasten sowie vereinzelte lymphatische Zellen der untersuchten Lymphknoten zeigten ebenfalls eine ggrd. immunhistochemische Reaktivität für Derlin-1. Extrazelluläres Derlin-1 wurde in Bereichen angrenzend an immunhistochemisch positive Zellen mit mittel- bis hochgradiger Proteinexpression beobachtet.



Abbildung 5: Graphische Darstellung der semiquantitativen Analyse der Derlin-1-Expression in (**A**) Adenomen mit korrespondierendem Normalgewebe, (**B**) Adenokarzinomen mit dazugehörigen Lymphknotenmetastasen und intravasalen Tumorzellemboli sowie korrespondierendem Normalgewebe. Gewebe ohne, mit geringgradiger (ggrd.), mittelgradiger (mgrd.) und hochgradiger (hgrd.) Proteinexpression sind dabei gegenübergestellt.

Bei der paarweise durchgeführten statistischen Analyse wurde eine signifikant verminderte Proteinexpression in der Gruppe der AD im Vergleich zum korrespondierenden NG festgestellt. Im Gegensatz dazu wiesen AK, LKM und IVTZ, verglichen zum NG, eine signifikant erhöhte Derlin-1-Expression auf. Die statistische Analyse der neoplastischen Gewebe untereinander machte eine signifikant erhöhte Proteinexpression in AK, LKM und IVTZ gegenüber AD deutlich. Ein Anstieg der Derlin-1-Expression war beim Vergleich der Gruppen AK, LKM und IVTZ zu verzeichnen, wobei intravaskuläre Tumorzellen die höchste Proteinexpression aufwiesen. Die Ergebnisse statistischen der Analyse der Derlin-1-Expression sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

	AD	AK	LKM	IVTZ
NG	p <sub>a</sub> = 0,004 *	p <sub>a</sub> = 0,001 *	p <sub>a</sub> ≤0,001 *	p <sub>a</sub> ≤0,001 *
AD	-	p <sub>b</sub> ≤0,001 *	p <sub>b</sub> ≤0,001 *	p <sub>b</sub> ≤0,001 *
AK	-	-	p <sub>a</sub> ≤0,001 *	$p_a \le 0,001$ *
LKM	-	-	-	p <sub>a</sub> ≤0,001 *

a = Wilcoxon Rangsummentest; b = Man-Whitney-U-Test, \*  $p \le 0.05$ 

Tabelle 4: Darstellung der Ergebnisse der statistischen Tests, die jeweils paarweise durchgeführt wurden. Signifikante Ergebnisse ( $p \le 0.05$ ) sind mit einem Stern (\*) markiert.





Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von Derlin-1 an Paraffinschnitten (Gegenfärbung mit Hämalaun). (A) Unverändertes Gewebe mit geringgradiger zytoplasmatischer Derlin-1-Expression (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m). (B) Adenom mit mittelgradiger zytoplasmatischer Derlin-1-Expression (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m). (C) intravasale Tumorzellemboli mit hochgradiger zytoplasmatischer Derlin-1-Expression (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m).

#### 5.3.2 TGF-β

Insgesamt 48 AD und 47 AK mit dazugehörigen LKM sowie das jeweilige korrespondierende unveränderte Milchdrüsengewebe wurden hinsichtlich der TGF-β-Expression immunhistochemisch untersucht. Epithelzellen mit positiver TGF-β-Reaktivität waren gut durch eine Braunfärbung des Zytoplasmas zu erkennen. Extrazelluläres TGF- $\beta$  wurde in vereinzelten Bereichen angrenzend an immunhistochemisch positive Zellen beobachtet. In 42 von 48 Fällen (87,5%) zeigte neoplastisch unverändertes Gewebe der Stichprobe 1 eine positive Reaktivität des Antikörpers TGF- $\beta$ . Im Gegensatz dazu konnte in nur 14 AD (27,1%) eine positive Proteinexpression festgestellt werden. Dabei erschien die Expression innerhalb der untersuchten benignen Neoplasien relativ homogen. Bei der Beurteilung der Stichprobe 2 fand in 39 von 47 Gewebeproben (83%) des NG eine positive Bewertung statt. AK und

entsprechende LKM mit positiver TGF- $\beta$ -Gewebeexpression konnten in 10 (21,3%) respektive 11 (23,4%) Fällen festgestellt werden. Positive AK und LKM exprimierten unterschiedlich stark TGF- $\beta$ . Dabei zeigte in den meisten Fällen nur ein kleiner Teil der Tumormasse ein positives Signal. Eine Assoziation der Proteinexpression mit einer speziellen Lokalisation im Tumor war jedoch nicht ersichtlich. Eine unspezifische Färbereaktion der untersuchten Gewebe wurde in keinem der Fälle beobachtet. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in Abbildung 10 graphisch dargestellt.





Abbildung 7: Graphische Darstellung der Anzahl der Gewebeproben mit und ohne TGF-β-Expression. (**A**) Adenome mit korrespondierendem Normalgewebe, (**B**) Adenokarzinome mit dazugehörigen Lymphknotenmetastasen sowie korrespondierendem Normalgewebe. Gewebe ohne immun-histochemisches Signal sind denen mit positiver Proteinexpression gegenübergestellt.

Bei der statistischen Analyse, die paarweise zwischen den Geweben erfolgte, konnte eine signifikant verminderte TGF-β-Proteinexpression in allen neoplastischen Geweben im Vergleich zum korrespondierenden NG festgestellt werden. Ein Vergleich zwischen AD, AK und LKM ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse der statistischen Analyse der TGF-β-Expression sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

	AD	AK	LKM
NG	p≤0,001 *	p≤0,001 *	p≤0,001 *
AD	-	p = 0,376	p = 0,524
AK	-	-	p = 0,804

Tabelle 5: Statistischer Vergleich der TGF- $\beta$ -Expression mittels x<sup>2</sup>-Tests, der jeweils paarweise durchgeführt wurde. Signifikante Ergebnisse (p  $\leq 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) markiert.



Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von TGF- $\beta$  an Paraffinschnitten (Gegenfärbung mit Hämalaun). (A) Unverändertes Gewebe mit starker zytoplasmatischer TGF- $\beta$ -Expression (Größenmaßstab = 100 µm). (C) Adenom und (E) Adenokarzinom mit zytoplasmatischer TGF- $\beta$ -Expression. (B) Normalgewebe (Größenmaßstab = 100 µm), (D) Adenom und (F) Adenokarzinom mit einem Verlust der zytoplasmatischen TGF- $\beta$ -Expression (Größenmaßstab = 100 µm).

#### 5.3.3 LTBP-4

Insgesamt 47 AD und 45 AK mit den dazugehörigen LKM sowie dem jeweiligen korrespondierenden NG wurden hinsichtlich der Proteinexpression von LTBP-4 ausgewertet. Dabei zeichneten sich die immunhistochemisch reaktiven Epithelzellen durch eine rotbraune Färbung des Zytoplasmas aus. Eine extrazytoplasmatische LTBP-4-Expression, ähnlich wie bei TGF-β, wurde vereinzelt angrenzend an immunhistochemisch positive Zellen beobachtet. Bei der Auswertung der nicht-neoplastischen Milchdrüsengewebe aus Stichprobe 1 präsentierte sich in 33 von 47 Fällen (70,2%) das NG mit einer positiven Reaktivität. Ähnliche Ergebnisse wies die Analyse des neoplastisch unveränderten Gewebes der Stichprobe 2 auf. Dabei zeigten 33 von 45 (73,3%) der untersuchten NG ein positives immunhistochemisches Signal. Eine relativ homogene Verteilung von positiven und negativen Ergebnissen konnte in der Gruppe der AD beobachtet werden. So zeigten 23 der insgesamt 47 (48,9%) untersuchten benignen Mammatumore eine positive LTBP-4-Expression. Die Analyse der AK und LKM ergab in 34 (75,6%) respektive 35 (77,8%) Fällen keine sichtbare Reaktivität des LTBP-4-Antikörpers. Dabei war in den meisten Fällen der untersuchten benignen und malignen Neoplasien nur ein geringer Teil der Tumormasse immunhistochemisch reaktiv. Ähnlich wie bei TGF
ß war eine Assoziation der Proteinexpression von LTBP-4 mit einer speziellen Lokalisation im Tumor nicht ersichtlich. Eine unspezifische Färbereaktion der untersuchten Gewebe wurde in keinem der Fälle beobachtet. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in der Abbildung 12 graphisch dargestellt.



Abbildung 9: Graphische Darstellung der Anzahl an Gewebeproben mit und ohne LTBP-4-Expression. (A) Adenome mit korrespondierendem Normalgewebe, (B) Adenokarzinome mit dazugehörigen Lymphknotenmetastasen sowie korrespondierendem Normalgewebe. Gewebe ohne immun-histochemisches Signal sind denen mit positiver Proteinexpression gegenübergestellt.

Bei der paarweise durchgeführten statistischen Analyse mit Hilfe des x<sup>2</sup>-Tests konnte eine signifikant verminderte LTBP-4-Proteinexpression in allen neoplastischen Geweben im Vergleich zum korrespondierenden NG festgestellt werden. Auch der Vergleich zwischen benignen und malignen Geweben zeigte eine signifikant erhöhte Proteinexpression von AD gegenüber AK und LKM auf. Lediglich beim Vergleich zwischen AK und ihren LKM konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

	AD	AK	LKM
NG	p = 0,036 *	p≤0,001 *	p≤0,001 *
AD	-	p = 0,015 *	p = 0,008 *
AK	-	-	p = 0,803

Tabelle 6: Statistischer Vergleich der LTBP-4 Expression mittels des  $x^2$ -Tests, der jeweils paarweise durchgeführt wurde. Signifikante Ergebnisse ( $p \le 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) markiert.



Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von LTBP-4 an Paraffinschnitten (Gegenfärbung mit Hämalaun). (A) Unverändertes Gewebe mit starker zytoplasmatischer LTBP-4-Expression (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m). (C) Adenom und (E) Adenokarzinom mit zytoplasmatischer LTBP-4-Expression (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m). (B) Normalgewebe (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m), (D) Adenom und (F) Adenokarzinom mit einem Verlust der zytoplasmatischen LTBP-4-Expression (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m).

#### 5.3.4 p27

Bei 48 AD mit korrespondierenden NG und 49 AK mit LKM sowie korrespondierenden NG erfolgte die Untersuchung hinsichtlich der immunhistochemischen Reaktivität von p27. Dabei wiesen Epithelzellen mit einer positiven Proteinexpression ein markantes rotbraunes, nukleäres Signal auf. Eine zytoplasmatische p27-Expression wurde in keinem der untersuchten Gewebe festgestellt.

Insgesamt 44 (91,7%) neoplastisch unveränderte Gewebe der Stichprobe 1 und 45 (91,8%) NG der Stichprobe 2 zeigten eine positive Proteinexpression. Bei der Untersuchung der Tumorgewebe war in der überwiegenden Anzahl der Fälle keine immunhistochemische Reaktivität sichtbar. Dabei waren 37 (77,1%) AD, 39 (79,6%) AK und 43 (87,8%) LKM p27-Antigen-negativ. Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten sowie vereinzelte lymphatische Zellen der untersuchten Lymphknoten wiesen zusätzlich eine p27-Expression auf. Eine unspezifische Färbereaktion der untersuchten Gewebe wurde in keinem der Fälle beobachtet.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in der Abbildung 14 graphisch dargestellt.





Abbildung 11: Graphische Darstellung der Anzahl an Gewebeproben mit und ohne p27-Expression. (A) Adenome mit korrespondierendem Normalgewebe, (B) Adenokarzinome mit dazugehörigen Lymph-knotenmetastasen sowie korrespondierendem Normalgewebe. Gewebe ohne immun-histochemisches Signal sind denen mit positiver Proteinexpression gegenübergestellt.

Bei der statistischen Analyse, die paarweise zwischen den Geweben erfolgte, konnte eine signifikant verminderte p27-Proteinexpression in allen neoplastischen Geweben im Vergleich zum jeweils korrespondierenden NG festgestellt werden. Ein Vergleich zwischen AD, AK und LKM ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse der statistischen Analyse der p27-Expression sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

	AD	AK	LKM
NG	p ≤ 0,001 *	p≤0,001 *	p≤0,001 *
AD	-	p = 0,764	p = 0,167
AK	-	-	p = 0,274

Tabelle 7: Statistischer Vergleich der p27-Expression mittels  $x^2$ -Tests, der jeweils paarweise durchgeführt wurde. Signifikante Ergebnisse (p  $\leq 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) markiert.



Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von p27 an Paraffinschnitten. (Gegenfärbung mit Hämalaun) (A) Normalgewebe (Größenmaßstab = 200  $\mu$ m), (C) Adenom und (E) Adenokarzinom mit nukleärer p27-Expression (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m. (B) Normalgewebe (Größenmaßstab = 200  $\mu$ m), (D) Adenom und (F) Adenokarzinom mit einem Verlust der nukleären p27-Expression (Größenmaßstab = 100  $\mu$ m).

#### 5.3.5 RAD51

Bei insgesamt 46 AD und 39 AK mit LKM und jeweiligem korrespondierenden NG wurde der prozentuale Anteil an immunhistochemisch positiven Zellen festgestellt. Dabei zeichneten sich reaktive Epithelzellen durch eine braune nukleäre Färbung aus. Eine zytoplasmatische RAD51-Expression wurde in keinem der untersuchten Gewebe festgestellt. Eine zusätzliche immunhistochemische RAD51-Reaktivät wurde in Fibroblasten, epidermalen Keratinozyten, Schweißdrüsen und in lymphatischen Zellen der untersuchten Lymphknoten beobachtet.

Im Durchschnitt zeigten 19,9% (Interquartilbereich = 18,75) der Epithelzellen des NG aus Stichprobe 1 eine positive RAD51-Proteinexpression. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Untersuchung des NG aus Stichprobe 2 mit durchschnittlich 20,3% (Interquartilbereich = 13,04) positivem nukleären Signal. AD hingegen wiesen mit einem Median von 27,1% (Interquartilbereich = 18,79) eine höhere RAD51-Expression auf. In der Gruppe der AK hatten im Durchschnitt 34,8% (Interquartilbereich = 14,43) der Tumorzellen eine positive immunhistochemische Reaktivität. Im Vergleich dazu wiesen LKM mit einem Median von 26,5% (Interquartilbereich = 19,31) eine verminderte RAD51-Expression auf. Bei den untersuchten benignen und malignen Neoplasien konnte keine Assoziation zwischen der Proteinexpression und der Lokalisation im Tumor festgestellt werden. Unspezifische Färbereaktionen der untersuchten Gewebe wurden in keinem der Fälle beobachtet. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in der Abbildung 16 graphisch dargestellt.



Abbildung 13: Graphische Darstellung des durchschnittlichen Anteils an Zellen mit RAD51-Expression. (A) Adenome mit korrespondierendem Normalgewebe, (B) Adenokarzinome mit dazugehörigen Lymphknotenmetastasen sowie korrespondierendem Normalgewebe.

Bei der paarweise durchgeführten statistischen Analyse konnte eine signifikant erhöhte RAD51-Expression in neoplastischen Geweben im Vergleich zum NG festgestellt werden. Auch der Vergleich von AK mit AD oder LKM zeigte einen signifikant höheren Anteil an

	AD	AK	LKM
NG	$p_a = 0,039 *$	$p_a \le 0,001$ *	$p_a = 0,023 *$
AD	-	$p_b = 0,005 *$	$p_b = 0,549$
AK	-	-	$p_a = 0,002 *$

positiven Zellen in AK. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen AD und LKM. Die Ergebnisse der statistischen Analyse der RAD51-Expression sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

a = Wilcoxon Rangsummentest; b = Man-Whitney-U-Test

Tabelle 8:StatistischerVergleich der RAD51 positiven Zellen mittelsWilcoxonRangsummen- und Man-Whitney-U-Test, die jeweils paarweise durchgeführt wurden.Signifikante Ergebnisse ( $p \le 0.05$ ) sind mit einem Stern (\*) markiert.







Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von RAD51 an Paraffinschnitten (Gegenfärbung mit Hämalaun, Größenmaßstab = 100  $\mu$ m). (A) Unverändertes Gewebe mit nukleärer RAD51-Expression in vereinzelten Epithelzellen. (B) Adenom mit RAD51-Expression in wenigen neoplastischen Zellen. (C) Adenokarzinom mit RAD51-Expression in zahlreichen neoplastischen Zellen. (D) Lymphknotenmetastase mit wenigen RAD51 positiven metastatischen Zellen.

#### 5.4 Korrelation des Expressionsniveaus der verschiedenen Proteine

Um Zusammenhänge der TGF-β-Expression mit der Proteinexpression von LTBP-4, p27 und RAD51 zu verifizieren, wurden die neoplastischen Gewebegruppen einzeln mit Hilfe statistischer Analysen ausgewertet. Für die Gruppe der AD ergaben sich dabei signifikante Unterschiede beim Vergleich zwischen TGF-β- und LTBP-4-Expression. Ein

Expressionszusammenhang bestand hingegen zwischen TGF- $\beta$ - und p27- sowie zwischen TGF- $\beta$ - und RAD51-Expression. Bei den untersuchten AK konnte ein Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$ -Expression und LTBP-4, p27- sowie RAD51-Proteinexpression festgestellt werden. LKM wiesen hingegen signifikante Expressionsunterschiede zwischen TGF- $\beta$ - und LTBP-4 auf. Ein Expressionszusammenhang beim Vergleich von p27 und RAD51 mit der immunhistochemischen Reaktivität von TGF- $\beta$  konnte in LKM ebenfalls deutlich gemacht werden. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

	LTBP-4	p27	RAD51
TGF-β (Vgl. AD)	$p_a = 0,036 *$	$p_a = 0,430$	$p_b = 0,671$
TGF-β (Vgl. AK)	$p_a = 0,488$	$p_a = 0,059$	$p_b = 0,172$
TGF-β (Vgl. LKM)	$p_a = 0,033 *$	$p_a = 0,539$	$p_b = 0,152$

 $a = x^2$ -Test; b = Man-Whitney-U-Test

Tabelle 9: Statistischer Vergleich zur Verifizierung von Expressionszusammenhängen mittels x<sup>2</sup>-Test und Man-Whitney-U-Test. Die Analyse, die jeweils paarweise durchgeführt wurde, erfolgte für jede Gewebegruppe separat. Signifikante Ergebnisse ( $p \le 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) markiert.

## 6 Diskussion

Mammatumore gehören zu den am häufigsten diagnostizierten Neoplasien bei weiblichen Hunden (Eichelberg and Seine 1996). Trotz der hohen Inzidenz sind die molekularen Mechanismen der Entstehung und Progression bis heute nicht eindeutig geklärt. Anlehnend an Ergebnisse zur Untersuchung der mRNA-Expression von Derlin-1, TGF- $\beta$ , LTBP-4, p27 und RAD51 in metastasierenden caninen Milchdrüsentumoren war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Expressionsunterschiede auf Proteinebene zu verifizieren und dabei deren potentiellen Einfluss auf die Entstehung bzw. Metastasierung caniner Mammatumore zu untersuchen.

# 6.1 Derlin-1: Ein Marker der *Unfolded protein response* ist erhöht exprimiert in malignen caninen Mammatumoren

Die Proteinsynthese im ER unterliegt ständigen Qualitätskontrollen, um die Freisetzung von korrekt gefalteten und funktionellen Proteinen zu gewährleisten. Dabei kommt es insbesondere beim Auftreten von zellulärem Stress zum gehäuften Auftreten fehlgefalteter Proteine, die bei Akkumulation zur Apoptose führen (Rao et al. 2004). Um ein Überleben der Zelle zu sichern, wird im Rahmen der UPR die Expression einer Reihe von Proteinen, darunter Derlin-1, veranlasst. Derlin-1 als Komponente des ERAD-Komplexes ist dabei maßgeblich an der Retranslokalisation fehlgefalteter Proteine aus dem Lumen des ER in das Cytosol beteiligt, um somit einen proteasomalen Abbau zu ermöglichen.

Dass Derlin-1 einen zytoprotektiven Einfluss auch auf neoplastische Zellen ausübt, konnte in einer humanmedizinischen Studie gezeigt werden, in der Tumorzellen mit einem Knockout im Derlin-1-Gen eine erhöhte Apoptoserate aufwiesen. Daneben zeigte sich in 66,7% der untersuchten Brustkarzinome eine deutliche Proteinexpression von Derlin-1 (Wang et al. 2008). Welchen Einfluss Derlin-1 an der Entstehung bzw. Progression caniner Mammatumore hat, sollte in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Dabei zeigte sich, ähnlich wie in der Untersuchung von Wang et al., dass maligne Tumore im Vergleich zum NG und benignen Gewebe eine verstärkte Derlin-1-Expression aufweisen. Beim Vergleich der Gruppen AK und LKM konnte sogar ein signifikanter Expressionsanstieg bei den Metastasen verzeichnet werden. Diese Feststellung deckt sich mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe an laser-mikro-dissezierten caninen Mammatumoren, bei denen eine signifikant höhere

m-RNA-Expression in LKM im Vergleich zum Primärtumor beobachtet wurde (Klopfleisch and Gruber 2008). Ein Maximum der Proteinexpression konnte in der vorliegenden Arbeit in der Gruppe der IVTZ festgestellt werden. Anhand der ermittelten Ergebnisse zeigt sich somit, dass die Derlin-1-Expression auch in caninen Mammatumoren mit zunehmender maligner Progression der Tumorzellen erhöht ist.

Über Gründe für den malignitätsassoziierten Anstieg der Proteinexpression von Derlin-1 in caninen Mammatumorzellen kann derzeit nur spekuliert werden. Während der Tumorentwicklung unterliegen neoplastische Zellen zahlreichen Stresssituationen, darunter Hypoxie, Nährstoffmangel, Änderungen im pH-Wert und eine ungenügende Vaskularisation (Gatenby 2003; Hockel 2001). Die verstärkte Derlin-1-Expression in der vorliegenden Studie könnte als Schutzmechanismus neoplastischer Zellen wirken und somit als Adaptationsvorgang an Stresssituationen während der Tumorprogression und Metastasierung verstanden werden. Insbesondere während der lymphatischen Streuung scheinen neoplastische Zellen einer stärkeren Stresssituation ausgesetzt zu sein, als dass im Primärtumor ohnehin der Fall ist. Als Stressoren bei der Metastasierung könnten ein verändertes Mikromilieu, der Verlust des Kontaktes zur EZM und der verminderte Zell-zu-Zell-Kontakt diskutiert werden. Die verminderte Derlin-1-Expression in AD im Vergleich zum neoplastisch unveränderten Gewebe, die sich mit einer reduzierten mRNA-Expression in über 50% der AD in den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deckt (Klopfleisch and Gruber 2008), könnte auf die mitunter vorhandene sekretorische Aktivität des NG zurückführbar sein. So steigt im Rahmen der Milchproduktion die Proteinsynthese deutlich an, die mit einem verstärkten Auftreten von fehlgefalteten Proteinen assoziiert sein könnte. Die verminderte Derlin-1-Expression in AD könnte somit auf eine eingeschränkte Milchsynthese der Tumorzellen zurückgeführt werden. Weiterhin kann vermutet werden, dass stressauslösende Mechanismen, wie Hypoxie oder Nährstoffmangel in AD, im Gegensatz zu AK und Metastasen eine untergeordnete Rolle spielen.

Die ermittelten signifikanten Expressionsunterschiede zwischen benignen und malignen Neoplasien und darüber hinaus der drastische Expressionsanstieg in den IVTZ lassen den Einsatz von Derlin-1 als Malignitätsmarker und als Marker für embolische Tumorzellen diskutieren. Da Derlin-1 sowohl in normalen Milchdrüsengeweben und AD als auch in AK exprimiert wird, setzt die Verwendung von Derlin-1 als Tumormarker eine aufwendige Quantifizierung voraus, die einen Einsatz in der Routinediagnostik fraglich erscheinen lässt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass AK, LKM und IVTZ eine erhöhte Derlin-1-Expression zeigen, die als ein adaptiver Mechanismus maligner Tumorzellen an Stress-induzierende Bedingungen verstanden werden könnte, und damit Derlin-1 eventuell mit einer malignen Progression und Metastasierung assoziiert ist.

# 6.2 Der Proliferationshemmer TGF-β und seinem Bindungsprotein LTBP-4 zeigen eine verminderte Expression in malignen caninen Mammatumoren

Zu den biologischen Funktionen von TGF- $\beta$  gehören u.a. die Regulation von Zelldifferenzierung und -proliferation. Über den TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg wird die transkriptionelle Regulation multipler Effektorgene vermittelt, die auf epitheliales Gewebe eine überwiegend proliferationshemmende Wirkung haben (Kim et al. 2005; Siegel and Massague 2003). Andererseits konnte im Rahmen der Karzinogenese für Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie eine duale Rolle sowohl als Tumorpromotor als auch als -suppressor festgestellt werden (Hartsough and Mulder 1997). Studien an humanen Brusttumoren zeigten eine wachstumsinhibierende Funktion von TGF- $\beta$  in den frühen Stadien der Karzinogenese auf, die im Laufe der Tumorprogression verloren geht und somit eine ungehinderte Zellproliferation bedingt (Benson 2004; de Caestecker et al. 2000; Derynck et al. 2001; Dublin et al. 1993; Koli and Arteaga 1996; Walker and Dearing 1992). Neben dem Einfluss auf die Zellproliferation übt TGF- $\beta$  durch Einflüsse auf das umliegende Stroma, durch Förderung der Angiogenese sowie durch immunsuppressive Eigenschaften einen indirekten tumorprogressiven Effekt aus (Derynck et al. 2001; Kim et al. 2005; Massague 1990; Pertovaara et al. 1994).

Welchen Einfluss TGF- $\beta$  an der Entstehung bzw. Progression caniner Mammatumore hat, ist bislang nur unzureichend geklärt. Bisherige Studien konnten verminderte TGF- $\beta$ -mRNA-Expressionen in 100% der untersuchten caninen AK und den dazugehörigen LKM im Vergleich zum NG zeigen (Klopfleisch et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse auf Proteinebene bestätigt werden. So wurde gezeigt, dass die Mehrheit an Karzinomen einen Verlust der TGF- $\beta$ -Proteinexpression im Vergleich zum NG aufwies.

Es zeigt sich somit, dass der Verlust des Proliferationshemmers TGF- $\beta$  bei der Entstehung und Progression caniner Mammatumore als proliferativer Stimulus dienen könnte.

TGF-β induziert in verschiedenen Geweben die p27-Expression und agiert somit indirekt als Zellzyklusregulator (Hengst et al. 1994; Polyak et al. 1994; Slingerland et al. 1994; Toyoshima and Hunter 1994). Die proliferative Wirkung des TGF-β-Verlustes könnte somit möglicherweise indirekt über die verminderte Proteinexpression von p27 in den neoplastischen Geweben vermittelt werden, die ebenfalls in der vorliegenden Studie beobachtet wurde. Gründe für die verminderte Expression von TGF-B in caninen Mammatumoren sind bislang unklar. Bekannt ist jedoch, dass die Prozessierung von TGF-B an die Anwesenheit von LTBP, einem als Chaperon agierenden Bindungsprotein, gekoppelt ist (Rifkin 2005). Die Analyse der LTBP-4-Proteinexpression in der vorliegenden Arbeit zeigte eine verminderte Expression in caninen Mammatumoren auf, die sich mit Aussagen aus humanmedizinischen Studien decken, in denen Neoplasien eine verringerte LTBP-4-Expression im Vergleich zum NG aufwiesen (Eklov et al. 1993; Henriksen et al. 1995; Mauel et al. 2007; Mizoi et al. 1993; Roth-Eichhorn et al. 2001; Sterner-Kock et al. 2002). Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression in benignen Mammatumoren im Vergleich zu den untersuchten malignen Neoplasien festgestellt werden. Ob die in der vorliegenden Arbeit gleichzeitig beobachtete verminderte Proteinexpression von LTBP-4 im Zusammenhang mit dem Verlust der TGF-B-Expression in caninen Mammatumoren steht, ist jedoch fraglich. So konnten sowohl für TGF-B als auch für LTBP-4 bereits auf transkriptioneller Ebene eine verminderte mRNA-Expression im neoplastischen Gewebe im Vergleich zum NG festgestellt Eine verminderte TGF-\beta-Expression allein aufgrund einer verminderten werden. posttranslationalen Prozessierung durch LTBP-4 ist somit unwahrscheinlich (Klopfleisch et al. 2009).

Die Hypothese, dass der Expressionsverlust von LTBP-4 an der Karzinogenese epithelialer Strukturen beteiligt sein könnte, wird durch Untersuchungen von LTBP-4-Knockout-Mäusen unterstützt, die eine Entwicklung von colorekatalen Adenokarzinomen zeigten (Sterner-Kock et al. 2002). Ursachen für den beobachteten malignitätsassoziierten Expressionverlust von LTBP-4 sind derzeit unklar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass canine Mammatumore eine deutlich reduzierte Proteinexpression von TGF- $\beta$  und LTBP-4 im Vergleich zum NG aufwiesen. Insbesondere AK zeichneten sich durch einen hgrd. Expressionsverlust an LTBP-4 aus. Es ist somit anzunehmen, dass der Expressionsverlust beider Proteine direkt mit der malignen Progression caniner Mammatumore assoziiert ist.

# 6.3 Expressionsverlust des negativen Zellzyklusregulators p27 in caninen Mammatumoren

Der Verlust der Kontrolle des Zellzyklus stellt einen wichtigen Mechanismus bei der dar. Entstehung von Tumoren Studien zu Proteinexpressionsprofilen von Zellzyklusregulatoren in caninen Mammatumoren liegen derzeit nur über Cyclin A, D1 und p53 vor (Murakami et al. 2000; Sfacteria et al. 2003). Dabei konnte eine Expression von Cyclin A in etwa der Hälfte der untersuchten malignen Mammatumore (Murakami et al. 2000) sowie eine positive Korrelation von Cyclin D1 mit der Proliferationsrate in caninen Neoplasien des Gesäuges festgestellt werden (Sfacteria et al. 2003). Um den Einfluss von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKI) im Rahmen der Karzinogenese caniner Mammatumore zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie die Proteinexpression von p27 in caninen neoplastischen Milchdrüsengeweben unterschiedlicher Dignität analysiert. Wie bereits in humanmedizinischen Studien an verschiedenen Tumoren beobachtet wurde, konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Proteinexpression in der Mehrzahl der neoplastischen Gewebe im Vergleich zum NG festgestellt werden (Abukhdeir and Park 2008; Alkarain and Slingerland 2004; Slingerland and Pagano 2000). Diese deckt sich mit früheren Studien, die eine verminderte mRNA-Expression von p27 in caninen Mammatumoren identifizierten. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Expressionslevel in einer Vielzahl der untersuchten AK und LKM. Hingegen war in der vorliegenden Studie der prozentuale Anteil von AD mit einem Verlust der p27-Proteinexpression mit 77,1% wesentlich höher als der Anteil der AD, die ein reduziertes p27mRNA-Level (40%) aufwiesen (Klopfleisch and Gruber 2009a). Der Grund für die festgestellte Diskrepanz könnte eine mögliche posttranskriptionelle Regulation der p27-Expression in AD sein.

Die Ursache der verminderten p27-Expression in caninen Mammatumoren ist bisher unklar. Es ist jedoch gut bekannt, dass die p27-Expression durch verschiedene extrazelluläre Wachstumsinhibitoren, darunter TGF- $\beta$ , stimuliert werden kann (Hengst et al. 1994; Koff et al. 1993; Polyak et al. 1994; Slingerland et al. 1994; Toyoshima and Hunter 1994). Der ebenfalls in der Studie festgestellte Verlust der TGF- $\beta$ -Expression in caninen Mammatumoren lässt vermuten, dass die Proteinexpressionen von p27 und TGF- $\beta$  in einem direkten Zusammenhang stehen könnten. Einige Autoren machen wiederum einen verstärkten proteolytischen Abbau für das reduzierte p27-Expressionslevel in Tumoren verantwortlich (Slingerland and Pagano 2000). Ob ähnliche Gründe zum Expressionsverlust von p27 in caninen Mammatumoren führen, bleibt offen.

Weiterhin könnte eine Mutation im p27-Genlokus für den Verlust der Proteinexpression verantwortlich sein, obgleich bei Untersuchungen von Brusttumoren dies nur in seltenen Fällen beobachtet werden konnte (Spirin et al. 1996). Da bislang keine Studien über genetische Veränderungen von p27 in caninen Geweben existieren, bleibt es weiteren Forschungsarbeiten vorbehalten, diese Fragestellung näher zu untersuchen.

Zusammenfassend erscheint der Einsatz von p27 als Tumormarker fraglich, da zwar in der überwiegenden Anzahl, jedoch nicht bei 100% der untersuchten Neoplasien ein Verlust der Proteinexpression festgestellt werden konnte. Die ähnlichen Expressionsprofile in benignen und malignen Tumoren verhindern weiterhin den Einsatz von p27 als Malignitätsmarker bzw. zur Erkennung von Neoplasien mit einem erhöhten Metastasierungspotential in caninen Mammatumoren. Nichtsdestotrotz scheint eine verminderte p27-Proteinexpression ein wichtiger Schritt in der Karzinogenese caniner Mammatumore zu sein.

# 6.4 Erhöhte RAD51-Expression als Marker für genomische Instabilität in caninen Mammatumoren

Die DNA ist ständigen exogenen und endogenen Einflüssen ausgesetzt, die potentiell erbgutschädigend sein können. Zur Sicherung der genomischen Integrität ist es daher erforderlich, dass geschädigte Bereiche rechtzeitig erkannt und entsprechende reparative Maßnahmen ergriffen werden. Ein wichtiger Mechanismus stellt dabei die homologe Rekombination dar, bei der RAD51 eine zentrale Rolle einnimmt (Johnson and Jasin 2000). Bei Funktionsverlust von RAD51 kommt es zum gehäuften Auftreten von DNA-Schäden, die in einer gestörten Zellfunktion, der Apoptose oder einer gesteigerten Mutationsrate resultieren können (Bertrand et al. 2003; Henning and Sturzbecher 2003). Untersuchungen zum Expressionsverhalten von RAD51 in humanen Brusttumoren kommen zu kontroversen Resultaten, bei denen sowohl eine Über- als auch eine verminderte Expression in neoplastischen Zellen beobachtet werden konnte (Maacke et al. 2000a; Maacke et al. 2000b; Soderlund et al. 2007; Yoshikawa et al. 2000). Ergebnisse aus der vorliegenden Studie, die das Proteinexpressionsprofil von RAD51 in caninen Mammatumoren erstmalig untersucht, zeigen eine signifikante Überexpression neoplastischer Gewebe im Vergleich zum NG auf. Darüber hinaus war das RAD51-Proteinexpressionslevel in malignen Primärtumoren höher als in den untersuchten benignen Neoplasien. Bei der Analyse des Proteinexpressionsprofils von RAD51 in LKM zeichnete sich eine deutlich verminderte Expression im Vergleich zur Gruppe der AK ab. Die Ergebnisse konnten somit die erhöhten RAD51-mRNA-Expression-Daten in LKM caniner Mammatumore nicht bestätigen (Klopfleisch and Gruber 2009b). Im Gegensatz dazu konnte die erhöhte mRNA-Expression in AK auf Proteinebene bestätigt werden. Gründe für die aufgezeigten Diskrepanzen zwischen mRNA- und Proteinexpression in LKM sind unklar. Möglicherweise sind, ähnlich wie bei p27 vermutet, posttranskriptionelle Regulationsmechanismen eine Ursache. Wie in immunhistochemischen Studien an Brusttumoren bereits beobachtet werden konnte, zeichnet sich auch in den dargelegten Ergebnissen ein Proteinexpressionsanstieg mit steigender Malignität ab (Maacke et al. 2000a; Maacke et al. 2000b). Da RAD51 eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen via homologer Rekombination einnimmt, könnte eine Überexpression in Neoplasien des caninen Gesäuges mit einer verstärkten genomischen Instabilität assoziiert sein. Diese resultiert wahrscheinlich aus der gesteigerten Proliferationsrate und erhöhten DNA-Replikation in malignen Tumoren. Ob die beobachtete verstärkte Proteinexpression von RAD51 auch mit einer erhöhten funktionellen Aktivität assoziiert ist, bleibt jedoch offen. Die verminderte Proteinexpression in LKM im Vergleich zum malignen Primärtumor könnte im Zusammenhang mit einem Selektionsprozess während der metastatischen Progression stehen. Zellen, die zur Metastasierung fähig sind, müssen spezielle Anforderungen erfüllen. Dazu zählen das Loslösen aus dem Zellverband, das Überleben während der Zirkulation und die Bildung eines neuen Zellverbandes in entfernt gelegenen Organen (Chambers 2002). Zu vermuten wäre, dass gerade die Tumorzellen mit einer verminderten RAD51-Expression in hohem Maße genetisch instabil sind und sich durch stattfindende Mutationsvorgänge zu neoplastischen Zellen mit der Fähigkeit zur Bildung von Tochtergeschwülsten entwickeln könnten.

Anlehnend an die Forschungsarbeiten von Kanamato et al., die postulierten, dass TGF- $\beta$  die Expression von RAD51 senken würde und somit indirekt zur genomischen Instabilität beiträgt, könnte der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Verlust der TGF- $\beta$ -Expression in einem indirekten Zusammenhang zur verstärkten RAD51-Expression in Primärtumoren gebracht werden (Kanamoto et al. 2002). Eine Interaktion von TGF- $\beta$  und RAD51 in caninen Gewebe wurde bislang noch nicht untersucht.

Der Einsatz von RAD51 als Malignitätsmarker bzw. als Marker potentiell metastasierender Tumorzellen in der Routinediagnostik erscheint aufgrund des aufwendigen Quantifizierungsverfahrens, trotz der signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen, als eher fraglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die beobachtete verstärkte Expression von RAD51 in neoplastischen Geweben als Indikator für genomische Instabilität angesehen werden könnte, und dass eine Beteiligung von RAD51 an der Entstehung und Progression caniner Mammatumore möglich scheint.

### 7 Zusammenfassung

Tumore der Gesäugeleiste gehören zu den am häufigsten diagnostizierten Neoplasien beim Hund. Trotz der hohen Inzidenz ist die Ursache der Entwicklung und Progression bis heute nicht eindeutig geklärt. Aufbauend auf Untersuchungen zur mRNA-Expression von Derlin-1, TGF-β, LTBP-4, p27 und RAD51 in laser-mikro-dissezierten Mammatumoren sollte die vorliegende Arbeit Aufschluss über die Proteinexpressionsprofile dieser Gene geben, um ihre Rolle bei der Entstehung und Progression caniner Mammatumore näher zu untersuchen. Dazu wurde der Proteingehalt von Derlin-1, TGF-β, LTBP-4, p27 und RAD51 mittels immunhistochemischer Verfahren in neoplastisch unverändertem Mammagewebe, benignen und malignen Mammatumoren sowie ihren Lymphknotenmetastasen ermittelt.

Die Auswertung der Derlin-1-Proteinexpression in der vorliegenden Arbeit erfolgte semiquantitativ und ergab eine verminderte Derlin-1-Expression in Adenomen während Adenokarzinome und ihre Lymphknotenmetastasen sowie insbesondere intravasale Tumorzellemboli eine signifikant erhöhte Derlin-1-Expression zeigten. Die ermittelten Proteinexpressionen decken sich mit den vorhandenen mRNA-Daten aus früheren Untersuchungen, bei denen eine signifikant höhere Expression in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor festgestellt werden konnte. Die Proteinexpression von Derlin-1 in malignen Mammatumoren weist auf eine verstärkte Stresssituation insbesondere von intravasalen Tumorzellemboli hin, die sekundär zu einem Anstieg der Derlin-1-Proteinexpression geführt hat. Andererseits könnte der Anstieg der Derlin-1-Expression auch eine primäre Voraussetzung für die erfolgreiche Metastasierung von Tumorzellen sein.

Bisherige Untersuchungen von TGF- $\beta$ , LTBP-4 und p27 in caninen Mammatumoren auf transkriptioneller Ebene zeigten eine verminderte Expression im neoplastischen Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe auf. Dies konnte durch die vorliegende Arbeit auf Proteinebene bestätigt werden. Dabei zeigten sowohl benigne als auch maligne Mammatumore ein signifikant vermindertes TGF- $\beta$ -, LTBP-4- und p27-Proteinexpressionsniveau im Vergleich zum Normalgewebe. Beim Vergleich der Tumorgruppen Adenom, Adenokarzinom und Lymphknotenmetastase konnten für TGF- $\beta$  und p27 keine deutlichen Unterschiede der Immunreaktivität beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war für LTBP-4 eine stärkere Proteinexpression in der Gruppe der Adenome erkennbar, die signifikante Unterschiede zum malignen Gewebe erkennen lies. Es kann somit angenommen werden, dass der Expressionsverlust der drei Proteine direkt mit der Karzinogenese caniner Mammatumore
in Verbindung steht, wobei der Verlust von TGF-β und p27 als ein früher Schritt in der Entstehung caniner Milchdrüsentumore angesehen werden kann.

Das RAD51-mRNA-Expressionsniveau in caninen Mammatumoren zeigte in früheren Arbeiten einen Malignitäts-assoziierten Expressionsanstieg auf mit einem Maximum in der Gruppe der Lymphknotenmetastasen. Diese Feststellung konnte in den vorliegenden Untersuchungen auf Proteinebene nur teilweise bestätigt werden. Die Proteinexpression von RAD51 zeigte eine signifikante Überexpression neoplastischer Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe auf. Darüber hinaus war das RAD51-Proteinexpressionslevel in Adenokarzinomen höher als in den Adenomen. Diskrepanzen ergaben sich hingegen bei der Analyse des Proteinexpressionsprofils von RAD51 in Lymphknotenmetastasen, die eine deutlich verminderte Expression im Vergleich zur Gruppe der Adenokarzinome aufwiesen. Anhand der ermittelten Proteindaten kann angenommen werden, dass die verstärkte Expression von RAD51 in neoplastischen Geweben als ein Indikator für genomische Instabilität angesehen werden kann und eine Beteiligung an der Karzinogenese caniner Mammatumore wahrscheinlich ist. Dabei könnte die Reduktion der Expression in Lymphknotenmetastasen mit einem Selektionsprozess von Tumorzellen mit verminderter RAD51-Expression während der metastatischen Progression im Zusammenhang stehen.

Weiterhin konnte in den verschiedenen Geweben eine signifikante positive Korrelation zwischen der TGF- $\beta$ - und p27- bzw. eine negative Korrelation der TGF- $\beta$ - und RAD51-Proteinexpression festgestellt werden.

Aufgrund der mitunter fehlenden signifikanten Unterschiede der Proteinexpressionen zwischen Adenomen und Adenokarzinomen und der teilweise aufwendigen Quantifizierung erscheint die Eignung von Derlin-1, TGF-β, LTBP-4, p27 und RAD51 als Tumor- bzw. Malignitätsmarker als fraglich.

Insgesamt zeigte sich, dass maligne Tumore durch eine verminderte Proteinexpression von TGF-β, LTBP-4 sowie p27 und eine erhöhte Derlin-1- und RAD51-Expression gekennzeichnet sind. Alle fünf Proteine scheinen somit potenziell einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Progression caniner Mammatumore haben zu können.

### 8 Summary

# Malignancy associated protein expression profiles of Derlin-1, TGF-β, LTBP-4, p27 and RAD51 in metastatic mammary tumors of the dog

Mammary tumors are the most common neoplasia in dogs. The cause of the mammary tumor carcinogenesis is far from being understood despite it's high incidence. Based on recent findings that show a transcriptional dysregulation of Derlin-1, TGF- $\beta$ , LTBP-4, p27 and RAD51 in laser microdissected tissue samples of canine mammary tumors, the aim of the following study was to analyze the protein expression profiles of these genes in benign and malignant canine mammary tumors. For that purpose Derlin-1, TGF- $\beta$ , LTBP-4, p27 and RAD51 were quantified immunohistochemically in non-neoplastic canine mammary gland, adenomas, adenocarcinomas and lymph node metastases of canine mammary tumors.

Derlin-1 was evaluated semiquantitatively and revealed weak to moderate expression in nonneoplastic mammary tissue and adenomas but expression was significantly increased in adenocarcinomas and lymph node metastases. Furthermore, intralymphatic tumor cells had significantly higher Derlin-1 expression levels. These protein expression levels are similar to mRNA expression levels found in an earlier study in the same subset of tumors. The increased protein expression of Derlin-1 in malignant canine mammary tumors and in particular in intravasal tumor cells suggest that these cells are exposed to increased levels of cellular stressors. However, it is also possible that an increased Derlin-1 expression is not merely a reaction but a primary cause for a successful metastatic spread of tumor cells. Previous studies revealed decreased TGF-B, LTBP-4 and p27 mRNA expression levels in canine mammary tumors when compared to non-neoplastic mammary gland. In the present study a similar decrease in protein expression levels were detected. Both benign and malignant mammary tumors showed significantly reduced protein expression levels of TGF-β, LTBP-4 and p27 when compared to normal mammary gland. However, no significant differences in TGF-β and p27 expression levels could be detected when adenomas, adenocarcinomas and lymph node metastases were compared. LTBP-4 protein expression was higher in adenomas when compared to malignant mammary gland. It seems therefore possible that loss of TGF- $\beta$ , LTBP-4 and p27 protein expression is directly associated with a more malignant behaviour of canine mammary tumors, whereas the decreased expression of TGF- $\beta$  and p27 may be an early step in the development of canine mammary tumors.

RAD51 mRNA expression are increased in neoplastic tissue when compared to normal mammary gland with a maximum expression in lymph node metastases. In the present study increased RAD51 protein expression levels could be confirmed for neoplastic tissue when compared to non-neoplastic mammary glands. Furthermore, primary carcinomas had increased RAD51 protein expression when compared with adenomas. However, the decreased RAD51 protein expression in lymph node metastases when compared to primary tumors was surprising and is in contrast to earlier studies on mRNA expression levels. By virtue of the identified protein data it can be assumed that the increased expression from RAD51 in neoplastic tissue can be regarded as an indicator for genomic instability and probably as a participant in the carcinogenesis of canine mammary tumors. The different expression levels in primary tumors and their lymph node metastases seem to be associated with a selective process during metastatic progression. A significant positive correlation between TGF-B and p27 and a negative correlation of the TGF- $\beta$  and RAD51 protein expression could also be detected. Nevertheless, the lack of significant differences of Derlin-1, TGF-B, LTBP-4, p27 and RAD51 protein expression between benign and malignant mammary neoplasia of the dog hinders the use as a marker for tumor cells and malignancy for this tumor type.

Altogether we showed that malignant tumors had a reduced protein expression of TGF- $\beta$ , LTBP-4 and p27 and an increased Derlin-1 and RAD51 expression level. All of these five proteins appear to have a potential direct or indirect influence on the progression of canine mammary tumors.

# 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Ausschnitt aus den WHO-Richtlinien zur histopathologischen	
	Klassifikation caniner Mammatumore (Misdorp et al. 1999)	6
Abbildung 2:	(A) Unverändertes Milchdrüsengewebe, (B) Einfaches Adenom	
	(C) Einfaches Adenokarzinom, (D) Lymphknotenmetastase.	32
Abbildung 3:	Graphische Darstellung der Hunderassen	33
Abbildung 4:	Graphische Darstellung der Verteilung caniner Mammatumore	34
Abbildung 5:	Graphische Darstellung der semiquantitativen Analyse der	
	Derlin-1-Expression	36
Abbildung 6:	Immunhistochemischer Nachweis von Derlin-1 an Paraffinschnitten	38
Abbildung 7:	Graphische Darstellung der Analyse der TGF-β-Expression	40
Abbildung 8:	Immunhistochemischer Nachweis von TGF-β an Paraffinschnitten	41
Abbildung 9:	Graphische Darstellung der Analyse der LTBP-4-Expression	43
Abbildung 10:	Immunhistochemischer Nachweis von LTBP-4 an Paraffinschnitten	45
Abbildung 11:	Graphische Darstellung der Analyse der p27-Expression	47
Abbildung 12:	Immunhistochemischer Nachweis von p27 an Paraffinschnitten	48
Abbildung 13:	Graphische Darstellung der Analyse der RAD51-Expression	50
Abbildung 14:	Immunhistochemischer Nachweis von RAD51 an Paraffinschnitten	52

# 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Angaben zu den verwendeten Primärantikörpern	
Tabelle 2:	DAB-Färbeprotokoll	27
Tabelle 3:	Antikörperspezifische Lokalisation der immunhistochemischen	
	Reaktivität	29
Tabelle 4:	Darstellung der Ergebnisse der statistischen Tests für Derlin-1	
Tabelle 5:	Statistischer Vergleich der TGF-β-Expression mittels x <sup>2</sup> -Tests	40
Tabelle 6:	Statistischer Vergleich der LTBP-4 Expression mittels des x <sup>2</sup> -Tests	44
Tabelle 7:	Statistischer Vergleich der p27-Expression mittels x <sup>2</sup> -Tests	47
Tabelle 8:	Statistischer Vergleich der RAD51 positiven Zellen mittels	
	Wilcoxon Rangsummen- und Man-Whitney-U-Test	51
Tabelle 9:	Statistischer Vergleich zur Verifizierung von Expressionszusammen-	
	hängen mittels x <sup>2</sup> -Test und Man-Whitney-U-Test	53
Tabelle 10:	Tabellarische Darstellung der untersuchten einfachen Adenome	85
Tabelle 11:	Tabellarische Darstellung der untersuchten metastasierenden	
	einfachen Adenokarzinome	87
Tabelle 12:	Protokoll der HE-Färbung im Färbegerät Auto Stainer XL	89
Tabelle 13	Protokoll zur Entparaffinisierung bzw. Rehydratation	90
Tabelle 14	Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe	91
Tabelle 15:	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von Derlin-1	94
Tabelle 16:	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von TGF-β	97

Tabelle 17:	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von LTBP-4100
Tabelle 18:	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von p27 103
Tabelle 19:	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von RAD51 106

# 11 Literaturverzeichnis

Abukhdeir AM, Park BH (2008) P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. Expert Rev Mol Med 10:e19

Alkarain A, Slingerland J (2004) Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. Breast Cancer Res 6:13-21

Argyle DJ, Turek MM, MacDonald VS (2008) Canine and feline mammary tumors. In: Decision Making in Small Animal Oncology. Edited by Argyle DA, Brearley M, Turek MM. Ames, Iowa: Blackwell Publishing:327-332

Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord CJ, Dexter T, Iravani M, Ashworth A, Silva A (2006) p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. EMBO Rep 7:219-224

Benson FE, Stasiak A, West SC (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. EMBO J 13:5764-5771

Benson JR (2004) Role of transforming growth factor beta in breast carcinogenesis. Lancet Oncol 5:229-239

Bertrand P, Lambert S, Joubert C, Lopez BS (2003) Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells. Oncogene 22:7587-7592

Blain SW, Massague J (2002) Breast cancer banishes p27 from nucleus. Nat Med 8:1076-1078

Bostedt H, Tammer I (1995) Kasuistischer Beitrag zur Prognose bei Mammatumoren des Hundes. Prakt Tierarzt 10:921-924

Bostock DE (1986) Canine and feline mammary neoplasms. Br Vet J 142:506-515

Brearley MJ (1989) Mammary gland tumors in the dog. In Practice 11:248-253

Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR (1983) Canine mammary gland neoplasms. JAmAnimHospAssoc 19:61-90

Casey HW, Giles RC, Kwapien RP (1979) Mammary neoplasia in animals: pathologic aspects and the effects of contraceptive steroids. Recent Results Cancer Res 66:129-160

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM (1997) Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. Nat Med 3:227-230

Chambers AF, Groom AC; MacDonald, IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nature Rev Cancer 2:563-572

Chiarle R, Pagano M, Inghirami G (2001) The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. Breast Cancer Res 3:91-94

Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 92:5545-5549

de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB (2000) Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. J Natl Cancer Inst 92:1388-1402

de Las Mulas JM, Millan Y, Dios R (2005) A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. Vet Pathol 42:200-212

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet 29:117-129

Dublin EA, Barnes DM, Wang DY, King RJ, Levison DA (1993) TGF alpha and TGF beta expression in mammary carcinoma. J Pathol 170:15-22

Eichelberg H, Seine R (1996) Lebenserwartung und Todesursachen bei Hunden. Zur Situation bei Mischlingen und verschiedenen Rassehunden. . Berl Münch Tierärztl Wschr 109:191-203

Eklov S, Funa K, Nordgren H, Olofsson A, Kanzaki T, Miyazono K, Nilsson S (1993) Lack of the latent transforming growth factor beta binding protein in malignant, but not benign prostatic tissue. Cancer Res 53:3193-3197

Erlanson M, Portin C, Linderholm B, Lindh J, Roos G, Landberg G (1998) Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. Blood 92:770-777

Eskens U (1983) Statistische Untersuchungen über nach den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifizerten Geschwülste des Hundes unter besonderer Berücksichtigung der Mamma- und Hauttumoren. Dissertation Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin

Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A (1997) Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. Cancer Res 57:3381-3385

Fidler IJ, Brodey RS (1967) The biological behaviour of canine mammary neoplasms. J Am Vet Med Assoc 151:1311-1318

Gatenby RAG, E.T. (2003) The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. Cancer Res 63:3847-3854

Gilbertson SR, Kurzmann ID, Zachrau RE (1983) Canine Mammary epithelial neoplasms: Biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. Vet Pathol 20:127-142

Giles RC, Kwapien RP, Geil RP (1978) Mammary nodules in beagle dogs administered investigational oral contraceptive steroids. J Natl Cancer Inst 60:1351-1364

Giltay R, Kostka G, Timpl R (1997) Sequence and expression of a novel member (LTBP-4) of the family of latent transforming growth factor-beta binding proteins. FEBS Lett 411:164-168

Gottwald D (1998) Ein Beitrag zur Häufigkeit von Mammatumoren beim Hund. Statistische Auswertung der Einsendungen einer Praxis für Tierpathologie aus den Jahren 1990 bis 1995. Dissertation Universität München, Fachbereich Veterinärmedizin

Guo Y, Sklar GN, Borkowski A, Kyprianou N (1997) Loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) protein in human prostate cancer correlates with tumor grade. Clin Cancer Res 3:2269-2274

Gutberlet K, Rudolph R (1996) Angiosis carcinomatosa bei der Hündin. Häufigkeit und Verbindung mit prognostisch wichtigen Faktoren. Kleintier-Prax 41 Heft 7:473-482

Hannon GJ, Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. Nature 371:257-261

Hartsough MT, Mulder KM (1997) Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. Pharmacol Ther 75:21-41

Harvey J (1990) Mammary Glands. Current Techniques in Small Animal Surgery:454-459

Hellmen E (1996) The pathogenesis of canine mammary tumors. Cancer J 9:282-286

Hellmen E, Bergstrom R, Holmberg L (1993) Prognostic factors in canine mammary tumors: A multivariate study of 202 consecutive cases. Vet Pathol 30:20-27

Hengst L (2003) Regulation der Zellproliferation. Max-Planck-Institut für Biochemie, Tätigkeitsbericht

Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI (1994) A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. Proc Natl Acad Sci USA 91:5291-5295

Henning W, Sturzbecher HW (2003) Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. Toxicology 193:91-109

Henriksen R, Gobl A, Wilander E, Oberg K, Miyazono K, Funa K (1995) Expression and prognostic significance of TGF-beta isotypes, latent TGF-beta 1 binding protein, TGF-beta type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. Lab Invest 73:213-220

Hockel M, Vaupel P. (2001) Bological consequences of tumor hypoxia. Semin Oncol 28:36-41

Inoue M, Wu H, Une S (2006) Immunohistochemical detection of p27 and p21 proteins in canine hair follicle and epidermal neoplasms. J Vet Med Sci 68:779-782

Johnson RD, Jasin M (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. EMBO J 19:3398-3407

Jordan RC, Bradley G, Slingerland J (1998) Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. Am J Pathol 152:585-590

Kanamoto T, Hellman U, Heldin CH, Souchelnytskyi S (2002) Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair. EMBO J 21:1219-1230

Katiyar S, Joshi S, Lennarz WJ (2005) The retrotranslocation protein Derlin-1 binds peptide:N-glycanase to the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell 16:4584-4594

Kessler M (1999) Mammatumoren. In: Martin Kessler (Hrsg.) Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Blackwell Wiss.-Verlag:261-272

Kim IY, Kim MM, Kim SJ (2005) Transforming growth factor-beta : biology and clinical relevance. J Biochem Mol Biol 38:1-8

Klausner RD, Sitia R. (1997) Protein degradation in the endoplasmatic reticulum Cell 62:611-614

Klopfleisch R, Gruber AD (2009a) Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. Res Vet Sci 87:91-96

Klopfleisch R, Gruber AD (2009b) Increased Expression of BRCA2 and RAD51 in Lymph Node Metastases of Canine Mammary Adenocarcinomas. Vet Pathol 46:416-422

Klopfleisch R, Gruber AD (2008) Derlin-1 and Stanniocalcin-1 are Differntially Regulated in Metastasizing Canine Mammary Adenocarcinomas. J Comp Path 141:113-120

Klopfleisch R, Schütze M, Gruber AD (2009) Downregulation of transforming growth factor beta (TGFbeta) and latent TGFbeta binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours. Veterinary Journal doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.014

Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J (1993) Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. Science 260:536-539

Koli K, Saharinen J, Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J (2001) Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. Microsc Res Tech 52:354-362

Koli KM, Arteaga CL (1996) Complex role of tumor cell transforming growth factor (TGF)beta s on breast carcinoma progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1:373-380

Kumaraguruparan R, Karunagaran D, Balachandran C, Manohar BM, Nagini S (2006a) Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. Clin Chim Acta 365:168-176

Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S (2006b) Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. Res Vet Sci 81:218-224 Kurzmann ID, Gilbertson SR (1986) Prognostic factors in canine mammary tumors. Semin Vet Med Surg 1:25-32

Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM (2002) PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. Nat Med 8:1153-1160

Liebich HG (2004) Milchdrüse (Glandula mammaria, Mamma, Euter, Gesäuge). In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer Verlag:323-327

Lilley BN, Ploegh HL (2005) Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. Proc Natl Acad Sci USA 102:14296-14301

Lilley BN, Ploegh HL (2004) A membran protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. Nature 429:834-840

Linke SP, Sengupta S, Khabie N, Jeffries BA, Buchhop S, Miska S, Henning W, Pedeux R, Wang XW, Hofseth LJ, Yang Q, Garfield SH, Sturzbecher HW, Harris CC (2003) p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. Cancer Res 63:2596-2605

Liu X, Sun Y, Ehrlich M, Lu T, Kloog Y, Weinberg RA, Lodish HF, Henis YI (2000) Disruption of TGF-beta growth inhibition by oncogenic ras is linked to p27Kip1 mislocalization. Oncogene 19:5926-5935

Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M (1997) Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. Nat Med 3:231-234

Lose F, Lovelock P, Chenevix-Trench G, Mann GJ, Pupo GM, Spurdle AB (2006) Variation in the RAD51 gene and familial breast cancer. Breast Cancer Res 8:R26

Maacke H, Jost K, Opitz S, Miska S, Yuan Y, Hasselbach L, Luttges J, Kalthoff H, Sturzbecher HW (2000a) DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. Oncogene 19:2791-2795

Maacke H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Kruger S, Feller AC, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Sturzbecher HW (2000b) Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. Int J Cancer 88:907-913

Mac Ewen EG, Withrow SJ (1996) Tumors of the Mammary gland. Small animal clinical oncology 2:356-372

MacEwen EG, Harvey HJ, Patnaik AK, Mooney S, Hayes A, Kurzman I, Hardy WD, Jr. (1985) Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. J Biol Response Mod 4:418-426

MacEwen EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Panko WB (1982) Estrogen receptors in canine mammary tumors. Cancer Res 42:2255-2259

Mangasser-Stephan K, Gressner AM (1999) Molecular and functional aspects of latent transforming growth factor-beta binding protein: just a masking protein? Cell Tissue Res 297:363-370

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 268:1336-1338

Masciullo V, Sgambato A, Pacilio C, Pucci B, Ferrandina G, Palazzo J, Carbone A, Cittadini A, Mancuso S, Scambia G, Giordano A (1999) Frequent loss of expression of the cyclindependent kinase inhibitor p27 in epithelial ovarian cancer. Cancer Res 59:3790-3794

Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. Annu Rev Cell Biol 6:597-641

Mauel S, Kruse B, Etschmann B, von der Schulenburg AG, Schaerig M, Stovesand K, Wilcken B, Sterner-Kock A (2007) Latent transforming growth factor binding protein 4

(LTBP-4) is downregulated in human mammary adenocarcinomas in vitro and in vivo. Apmis 115:687-700

McCune BK, Mullin BR, Flanders KC, Jaffurs WJ, Mullen LT, Sporn MB (1992) Localization of transforming growth factor-beta isotypes in lesions of the human breast. Hum Pathol 23:13-20

Misdorp W (1991) Progestogens and mammary tumors in dogs and cats. Acta Endocrinol 125(Suppl):27-31

Misdorp W, Den Herder BA (1966) Bone metastasis in mammary cancer. A report of 10 cases in the female dog and some comparison with human cases. Brit J Cancer 20:496-503

Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP (1999) Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. Washington, DC, Bulletin of The World Health Organisation, International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals

Misdorp W, Hart AA (1979) Canine mammary cancer. I. Prognosis. J Small Anim Pract 20:385-394

Misdorp W, Hart AAM (1976) Prognostic factors in canine mammary cancer. J Natl Cancer Inst 56:779-786

Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH (1991) A role of the latent TGF-beta 1binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. EMBO J 10:1091-1101

Miyazono K, Thyberg J, Heldin CH (1992) Retention of the transforming growth factor-beta 1 precursor in the Golgi complex in a latent endoglycosidase H-sensitive form. J Biol Chem 267:5668-5675

Mizoi T, Ohtani H, Miyazono K, Miyazawa M, Matsuno S, Nagura H (1993) Immunoelectron microscopic localization of transforming growth factor beta 1 and latent transforming growth factor beta 1 binding protein in human gastrointestinal carcinomas: qualitative difference between cancer cells and stromal cells. Cancer Res 53:183-190

Mizukami Y, Nonomura A, Yamada T, Kurumaya H, Hayashi M, Koyasaki N, Taniya T, Noguchi M, Nakamura S, Matsubara F (1990) Immunohistochemical demonstration of growth factors, TGF-alpha, TGF-beta, IGF-I and neu oncogene product in benign and malignant human breast tissues. Anticancer Res 10:1115-1126

Morrison WB (1998) Canine and feline mammary tumors. In: Cancer in dogs and cats. Edited by Morrison WB, Baltimore, Williams and Wilkins :591-598

Murakami Y, Tateyama S, Rungsipipat A, Uchida K, Yamaguchi R (2000) Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. J Vet Med Sci 62:743-750

Nieto A, Perez-Alenza MD, Del Castillo N, Tabanera E, Castano M, Pena L (2003) BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. J Comp Pathol 128:260-268

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Science 269:682-685

Park K, Kim SJ, Bang YJ, Park JG, Kim NK, Roberts AB, Sporn MB (1994) Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. Proc Natl Acad Sci USA 91:8772-8776

Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI (1991) Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. J Cell Biol 115:1091-1105

Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K (1994) Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. J Biol Chem 269:6271-6274 Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes Dev 8:9-22

Priester WA, McKay FW (1980) The occurrence of tumors in domestic animals. Natl Cancer Inst Monogr 54:1-210

Qiao GB, Wu YL, Yang XN, Zhong WZ, Xie D, Guan XY, Fischer D, Kolberg HC, Kruger S, Stuerzbecher HW (2005) High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. Br J Cancer 93:137-143

Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T (2002) Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. Cancer Res 62:219-225

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell Death Differ 11:372-380

Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. Genes Dev 9:1831-1845

Richardson C, Stark JM, Ommundsen M, Jasin M (2004) Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. Oncogene 23:546-553

Rifkin DB (2005) Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. J Biol Chem 280:7409-7412

Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Thiagalingam S (1997) Frequency of Smad gene mutations in human cancers. Cancer Res 57:2578-2580

Roberts AB (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta. Miner Electrolyte Metab 24:111-119 Robinson SD, Silberstein GB, Roberts AB, Flanders KC, Daniel CW (1991) Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor-beta isoforms in mouse mammary gland development. Development 113:867-878

Rodo A, Malicka E (2008) Immunohistochemical expression of protein p53 in neoplasms of the mammary gland in bitches. Pol J Vet Sci 11:89-95

Romanucci M, Marinelli A, Sarli G, Della Salda L (2006) Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. BMC Cancer 6:171

Roth-Eichhorn S, Heitmann B, Flemming P, Kubicka S, Trautwein C (2001) Evidence for the decreased expression of the latent TGF-beta binding protein and its splice form in human liver tumours. Scand J Gastroenterol 36:1204-1210

Rungsipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N, Hayashi T (1999) Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. J Vet Med Sci 61:27-32

Rutteman GR (1992) Contraceptive steroids and the mammary gland: is there a hazard? Insights from animal studies. Breast Cancer Res Treat 23:29-41

Rutteman GR, Misdorp W, Blankenstein MA, van den Brom WE (1988) Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. Br J Cancer 58:594-599

Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG (2001) Tumors of the Mammary Gland. In: Small Animal Clinical Oncology. Edited byWithrow M, Philadelphia, Saunders Company :455-477

Saharinen J, Taipale J, Monni O, Keski-Oja J (1998) Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-beta-binding protein, LTBP-4. J Biol Chem 273:18459-18469

Schneider R (1970) Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. Cancer 26:419-426

Schneider R, Dorn CR, Taylor DO (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. J Natl Cancer Inst 43:1249-1261

Serra R, Crowley MR (2003) TGF-beta in mammary gland development and breast cancer. Breast Dis 18:61-73

Sfacteria A, Bertani C, Costantino G, Del Bue M, Paiardini M, Cervasi B, Piedimonte A, De Vico G (2003) Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. J Comp Pathol 128:245-251

Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev 13:1501-1512

Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. Nat Med 8:1145-1152

Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, Ushio N, Ikeo K, Ogawa T (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. Nat Genet 4:239-243

Shirane M, Harumiya Y, Ishida N, Hirai A, Miyamoto C, Hatakeyama S, Nakayama K, Kitagawa M (1999) Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. J Biol Chem 274:13886-13893

Siegel PM, Massague J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. Nat Rev Cancer 3:807-821

Simon D, Goronzy P, Stephan I, Meyer-Lindenberg A, Aufderheide M, Nolte I (1996) Mammatumoren beim Hund: Untersuchung zu Vorkommen und Verlauf der Erkrankung. Prakt Tierarzt 77:771-782

Singh SP, Lipman J, Goldman H, Ellis FH, Jr., Aizenman L, Cangi MG, Signoretti S, Chiaur DS, Pagano M, Loda M (1998) Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. Cancer Res 58:1730-1735

Slingerland J, Pagano M (2000) Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. J Cell Physiol 183:10-17

Slingerland JM, Hengst L, Pan CH, Alexander D, Stampfer MR, Reed SI (1994) A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. Mol Cell Biol 14:3683-3694

Soderlund K, Skoog L, Fornander T, Askmalm MS (2007) The BRCA1/BRCA2/Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer. Radiother Oncol 84:242-251

Spirin KS, Simpson JF, Takeuchi S, Kawamata N, Miller CW, Koeffler HP (1996) p27/Kip1 mutation found in breast cancer. Cancer Res 56:2400-2404

Sporn MB, Roberts AB (1992) Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. J Cell Biol 119:1017-1021

Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, Kuhlmeier K, Kirchner T, Jin S, Keski-Oja J, von Melchner H (2002) Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. Genes Dev 16:2264-2273

Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J (1994) Latent transforming growth factorbeta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. J Cell Biol 124:171-181

Taipale J, Saharinen J, Hedman K, Keski-Oja J (1996) Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. J Histochem Cytochem 44:875-889

Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Magi-Galluzzi C, Lavin P, Draetta G, Pagano M, Loda M (1997) The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. Cancer Res 57:1259-1263 Thacker J (2005) The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. Cancer Lett 219:125-135

Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB (2005) Latent TGFbeta binding proteins. Int J Biochem Cell Biol 37:38-41

Toyoshima H, Hunter T (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. Cell 78:67-74

Venkitaraman AR (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell 108:171-182

Viglietto G, Motti ML, Fusco A (2002) Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization. Cell Cycle 1:394-400

Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M (1998) Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. Nucleic Acids Res 26:2859-2864

Wakefield LM, Piek E, Bottinger EP (2001) TGF-beta signaling in mammary gland development and tumorigenesis. J Mammary Gland Biol Neoplasia 6:67-82

Walker RA, Dearing SJ (1992) Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. Eur J Cancer 28:641-644

Wang J, Hua H, Ran Y, Zhang H, Liu W, Yang Z, Jiang Y (2008) Derlin-1 is overexpressed in human breast carcinoma and protects cancer cells from endoplasmic reticulum stressinduced apoptosis. Breast Cancer Res 10:R7

Warner MR (1976) Age incidence and site distribution of mammary dysplasias in young beagle bitches. J Natl Cancer Inst 57:57-61

Welch DR, Fabra A, Nakajima M (1990) Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. Proc Natl Acad Sci USA 87:7678-7682 White (1998) Das Gesäuge. In: Kompendium der Onkologie in der Veterinärmedizin. Edited by Gorman NT, Schlütersche Verlagsanstalt :199-203

Withrow SJ, MacEwen EG (2001) Tumors of the Mammary Gland. In: Small Animal Clinical Oncology. Edited by Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG, Saunders :455-477

Wu H, Hayashi T, Inoue M (2004) Immunohistochemical expression of p27 and p21 in canine cutaneous mast cell tumors and histiocytomas. Vet Pathol 41:296-299

Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M (1996) Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. J Small Anim Pract 37:462-464

Yang WY, Liu CH, Chang CJ, Lee CC, Chang KJ, Lin CT (2006) Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. J Comp Pathol 134:70-79

Ye YS, Y.; Yun, C.; Ron, D.; Rapoport, T.A. (2004) A membran protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. Nature 429:841-847

Yoshikawa K, Ogawa T, Baer R, Hemmi H, Honda K, Yamauchi A, Inamoto T, Ko K, Yazumi S, Motoda H, Kodama H, Noguchi S, Gazdar AF, Yamaoka Y, Takahashi R (2000) Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. Int J Cancer 88:28-36

Zhang K, Kaufmann R.J. (2006) The unfolded protein response. Neurology 66:102-109

# 12 Anhang

# 12.1 Anhang zum Kapitel Material und Methoden

### 12.1.1 Tabelle des Untersuchungsmaterials

E-Nr.	Rasse	Tumorlokalisation
523/08 G	Labrador	MK2
1092/08 B	Dackel	MK2, MK3
1210/08 B	West Highland White Terrier	k.A.
1311/08 B	Dackel	k.A.
1362/08 A	k.A.	k.A.
1367/08	Chihuahua	k.A.
1450/08 C	Mischling	MK2
1581/08	Schnauzer	k.A.
1672/08 D	Border Collie	k.A.
1673/08 B	Spaniel	MK4
1726/08 D	Yorkshire Terrier	MK2
1726/08 F	Yorkshire Terrier	MK4
1788/08	Mischling	k.A.
1894/08 C	Husky	MK1
1894/08 E	Husky	k.A.
1928/08 C	Mischling	k.A.
2033/08	Hovaward	k.A.
2048/08 C	Husky	MK1, MK2, MK3
2139/08	Mischling	k.A.
2320/08 B	West Highland White Terrier	k.A.
2398/08 D	Mischling	MK2, MK3
2398/08 B	Mischling	MK4
2432/08 B	k.A.	MK5
2477/08 A	Spaniel	MK4
2477/08 C	Spaniel	MK5
2565/08 C	Dackel	MK2, MK5
2881/08 C	k.A.	k.A.
2881/08 A	k.A.	k.A.

 Tabelle 10:
 Tabellarische Darstellung der untersuchten einfachen Adenome

2881/08 B	k.A.	k.A.
2882/08 A1	Deutsch Kurzhaar	MK5
2882/08 C	Deutsch Kurzhaar	k.A.
2914/08	Saluki	MK2
2917/08	Mischling	k.A.
2939/08 B	Mischling	MK2
2939/08 C	Mischling	MK3
2939/08 D	Mischling	MK4
3034/08 D	Jack Russel	k.A.
3034/08 C	Jack Russel	MK4
3034/08 E	Jack Russel	MK5
3089/08 E	Eurasier	MK5
3111/08	Mischling	k.A.
3174/08 B	Collie	MK4
3233/08 A	Boxer	k.A.
3237/08 B	Boxer	k.A.
3252/08 B	k.A.	k.A.
3256/08 B	Spaniel	k.A.
3303/08	Mischling	MK4
3341/08 D	Boxer	MK5

E-Nr.	Rasse	Tumorlokalisation
0085/00	k.A.	k.A.
1994/00	Cairn Terrier	k.A.
2110/00	k.A.	k.A.
1724/01	k.A.	k.A.
1884/01	k.A.	k.A.
2261/01	Dackel	k.A.
0379/03	Dobermann	k.A.
1201/03	Mischling	k.A.
1963/03	k.A.	k.A.
1545/05	k.A.	k.A.
1801/05	k.A.	k.A.
2772/05	Mischling	k.A.
2802/05	Mischling	k.A.
2890/05	Collie	k.A.
2928/05	Dalmatiner	k.A.
0868/06	Mischling	MK4, MK5
1512/06	Dackel	k.A.
1782/06	Mischling	k.A.
2238/06	Hovaward	k.A.
2275/06	Mischling	MK3, MK4, MK5
2941/06	Mischling	MK4, MK5
0031/07	Mischling	k.A.
0206/07	Sheltie	k.A.
0517/07	Mischling	MK5
0825/07	k.A.	k.A.
0833/07	West Highland White Terrier	k.A.
0842/07	Yorkshire Terrier	MK5
1160/07	Pudel	MK4
1509/07	Dackel	k.A.

Tabelle 11:TabellarischeDarstellungderuntersuchtenmetastasierendeneinfachenAdenokarzinome

1822/07	k.A.	k.A.
1932/07	Hovaward	k.A.
2243/07	Bayr. Gebirgsschweißhund	MK4, MK5
2352/07	k.A.	k.A.
2509/07	k.A.	MK3, MK4, MK5
2557/07	Golden Retriever	MK3
2609/07	Dackel	MK3
2623/07	Husky	MK4, MK5
2747/07	West Highland White Terrier	MK1, MK2
2832/07	k.A.	MK5
3208/07	Mischling	MK5
0152/08	Mischling	k.A.
0738/08	Dackel	MK5
1128/08	Pudel	MK5
1232/08	West Highland White Terrier	MK5
1881/08	Französische Bulldogge	MK4
2228/08	Mischling	MK3, MK4, MK5
2416/08	Beagle	MK3
2431/08	Mischling	MK4, MK5
2566/08	Mischling	MK2, MK4, MK5

#### 12.1.2 Geräte für die Herstellung von Paraffinschnitten

- · Rotationsmikrotom HM 325 (Fa. Microm GmbH, Deutschland)
- · Paraffinstreckbad (Fa. Medax Nagel GmbH, Deutschland)
- Thermostat Typ A (Fa. Melag, Deutschland)
- · Färbegerät Auto Stainer XL (Fa. Leica, Deutschland)
- · Eindeckautomat CV5030 (Fa. Leica, Deutschland)

#### 12.1.3 Verbrauchsmaterialien für die Herstellung von Paraffinschnitten

- · Microtom Klingen (Fa. Microm SEC 35, Deutschland)
- · Objektträger Star Frost (Fa. Langenbrinck, Deutschland)
- · Deckgläser (Fa. Langenbrinck, Deutschland)

### 12.1.4 Protokoll für die HE-Färbung

Substanz	Zeit in min	Wiederholungen	
Entparaffinieren und Rehydrieren			
Xylol	3	3	
Ethanol (100%)	2	2	
Ethanol (96%)	2	2	
Ethanol (70%)	2	1	
Wasser	1	1	
	HE-Färbung		
Hämalaun	8	1	
Wasser	10	1	
Eosin	0,10	1	
Wasser	0,50	1	
	Dehydrieren		
Ethanol (70%)	0,50	1	
Ethanol (96%)	0,50	2	
Ethanol (100%)	0,50	2	
Xylol	0,50	3	
	Eindecken		

Tabelle 12: Protokoll der HE-Färbung im Färbegerät Auto Stainer XL (Fa. Leica, Deutschland) und automatisches Eindecken am Eindeckautomat CV5030 (Fa. Leica, Deutschland).

## 12.1.5 Lösungen für die HE-Färbung

- Hämalaum nach Mayr (Fa. Roth)
- wässriges Eosin 1% (Fa. Waldeck)

#### 12.1.6 Protokoll für die immunhistochemische Färbung

Substanz	Zeit in min	Wiederholungen
Xylol	10	2
Ethanol (100%)	3	2
Ethanol (96%)	3	2
Ethanol (70%)	3	1

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte

 Tabelle 13
 Protokoll zur Entparaffinisierung bzw. Rehydratation

- Hemmung der endogenen Peroxidase in 180 ml Methanol mit Zugabe von 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ig) f
  ür 30 min bei Raumtemperatur
- 3. Spülen der Schnitte in Aqua dest. und im Anschluss Lagerung bis zum nächsten Schritt in PBS (pH 7,4)
- 4. Demaskierung der Antigene mittels Hitze- oder Enzymbehandlung
- 5. Dreimaliges Spülen in PBS
- 6. Umlagerung der Schnitte in eine feuchte Kammer
- Blocken von unspezifischen Bindungen durch Zugabe von Ziegennormalserum mit Zusatz von PBS/BSA (2%) im Verhältnis 1:4 für 30 min bei Raumtemperatur (je 100 μl)
- 8. Überstand abgießen
- Inkubation mit Primärantikörper bzw. dem Kontrollserum verdünnt in PBS/BSA (2%) auf die Verbrauchskonzentration über Nacht bei 4°C (je 100 μl)
- 10. Schnitte angleichen an Raumtemperatur für 30 min
- 11. Überstand abgießen
- 12. Dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS
- Zugabe des entprechenden biotinylisierten Sekundärantikörpers verdünnt in PBS mit Zugabe von Ziegennormalserum (1,5%) in einem Verhältnis von 1:200 für 30 min bei Raumtemperatur (je 100 μl)
- 14. Überstand abgießen
- 15. Dreimaliges Spülen mit PBS
- Auftragen der ABC-Lösung, die mind. 30 Minuten vorher nach Herstellerangaben angesetzt wurde (1 ml PBS + 20 μl Reagenz A + 20 μl Reagenz B), Inkubation 30 min (je 100 μl)

- 17. Überführen der Schnitte in Küvette und zweimaliges Spülen in Aqua dest.
- DAB-Lösung ansetzen mit 180 ml Aqua dest. und 4 Tabletten DAB, unter Rühren auflösen
- 19. Zugabe von 16  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% ig)
- 20. Überführen der Schnitte in DAB-Lösung bei Einhaltung der ermittelten DAB-Färbezeiten
- 21. Schnitte in Leitungswasser mehrmals spülen und im Anschluss Lagerung in Leitungswasser für 10 min
- 22. Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayr für 20 s
- 23. Schnitte in Leitungswasser mehrmals spülen und im Anschluss zum Bläuen in Leitungswasser 10 min lagern
- 24. Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und anschließende Lagerung in Xylol

Substanz	Zeit in min	Wiederholungen
Ethanol (70%)	3	2
Ethanol (96%)	3	2
Ethanol (100%)	3	3
Xylol	2	2

 Tabelle 14
 Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe

25. Eindecken der Schnitte im Eindeckautomaten mit einem xylolhaltigen Eindeckmittel

#### 12.1.7 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung

- Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe)
- · H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%ig (Fa. Merck, Deutschland)
- Protease (AppliChem, Biochemica)
- · Triton-X-100 (Fa. Sigma, USA)
- · Ziegennormalserum (Tierklinik für Fortpflanzung, FU Berlin)
- Bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich)

- Kommerzielle Primärantikörper:
  - Derlin-1, *rabbit antibody* (Fa. Sigma, Saint Louis, Missouri, USA, Katalog-Nr.: D4443)
  - TGF-β3(V), *polyclonal rabbit antibody* (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA, Katalog-Nr.: sc-82)
  - LTBP-4, *polyclonal rabbit antibody* (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA, Katalog-Nr.: sc-33144)
  - p27 (C-19), *polyclonal rabbit antibody* (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA, Katalog-Nr.: sc-528)
  - · RAD51, polyclonal, rabbit (Fa. Calbiochem, USA, Katalog-Nr.: PC130T)
- · Kommerzielle Sekundärantikörper, biotinyliert:
  - · Goat-anti-rabbit IgG (Fa. Vector, Burlingame, USA, Katalog-Nr.: BA-1000)
- · DAB-Puffertabletten (Fa. Merck KGaA, Darmstadt)
- · Vectastain, Elite ABC Kit (Fa. Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)

#### 12.1.8 Lösungen und Puffer für die immunhistochemische Färbung

•	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	
	Lösung A (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O 27,6 g/l)	95 ml
	Lösung B (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O 35,6 g/l)	405 ml
	NaCl	90g
	Aqua dest.	ad 1 1

100 ml der hergestellten Lösung verdünnen mit 900 ml Aqua dest. und Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mit Salzsäure-Lösung (0,5 mol/l; Fa. Merck) Lagerung bei Raumtemperatur

• Citratpuffer pH 6,0

Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure, Fa. Roth)	9 ml
Stammlösung B (0,1 M Natriumcitrat, Fa. Sigma)	41 ml
Aqua dest.	ad 500 ml

Lagerung bei 4°C

•	Protease/PBS Lösung	
	Protease (AppliChem, Biochemica)	0,1 g
	PBS-Lösung (pH 7,4)	100 ml
	Lösen und 20 min bei 37°C vorwärmen	
	Lagerung der Protease bei 4°C	
•	DAB-Lösung	
	DAB-Puffertabletten (Fa. Merck KGaA, Darmstadt)	4 Stück
	PBS-Lösung (pH 7,4)	180 ml
	unter Rühren auflösen	
	Lagerung der DAB-Tabletten bei 4°C	

n-1-	IVTZ	.p.	d.	d.		d.	d.	d.	-q.			d.	d.	d.	d.	d.	d.	d.	hord =
Derli	Expressic	ıgh	hgr	lgi	k. <i>i</i>	hgr	hgr	hgr	ıgm	k. <i>i</i>	k. <i>i</i>	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr	tteløradiø
Derlin-1-	Expression LKM	mgrd.	mgrd.	hgrd.	hgrd.	mgrd.	hgrd.	hgrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	hgrd.	hgrd.	mgrd.	hgrd.	die merd = mit
Derlin-1-	Expression AK	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	hgrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	hgrd.	mgrd.	ggrd.	hgrd.	erd. = eerrinerad
Derlin-1-	Expression NG	ggrd.	keine Expression	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	keine Expression	ggrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	von Derlin-1. G
E-Nr.		0085/00	1994/00	2110/00	1724/01	1884/01	2261/01	0379/03	1201/03	1963/03	1545/05	1801/05	2772/05	2802/05	2890/05	2928/05	0868/06	1512/06	Untersuchung
Derlin-1-	Expression AD	mgrd.	hgrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	munhistochemischer
Derlin-1-	Expression NG	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	rgebnisse der imr
E-Nr.		523/08 G	1092/08 B	1210/08 B	1311/08 B	1362/08 A	1367/08	1450/08 C	1581/08	1672/08 D	1673/08 B	1726/08 D	1726/08 F	1788/08	1894/08 C	1894/08 E	1928/08 C	2033/08	Tabelle 15: E

12.2 Anhang der immunhistochemischen Auswertung

b **0** μ, a nuntistochemisch brgebnisse der immunnistocnem hochgradig, k.A. = keine Angabe

hgrd.	hgrd.	hgrd.	hgrd.	hgrd.	hgrd.	hgrd.	k.A.	k.A.	hgrd.	k.A.	hgrd.	mgrd.	hgrd.	mgrd.	hgrd.	k.A.	k.A.	hgrd.	mgrd.	hgrd.	hgrd.
mgrd.	mgrd.	hgrd.	hgrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	hgrd.	ggrd.	hgrd.	mgrd.	hgrd.	ggrd.	mgrd.	hgrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.
mgrd.	hgrd.	mgrd.	hgrd.	ggrd.	ggrd.	hgrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	hgrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	hgrd.	mgrd.
mgrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	keine Expression	mgrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	keine Expression	ggrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.
1782/06	2238/06	2275/06	2941/06	0031/07	0206/07	0517/07	0825/07	0833/07	0842/07	1160/07	1509/07	1822/07	1932/07	2243/07	2352/07	2509/07	2557/07	2609/07	2623/07	2747/07	2832/07
ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	keine Expression
ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	keine Expression
2048/08 C	2139/08	2320/08 B	2398/08 D	2398/08 B	2432/08 B	2477/08 A	2477/08 C	2565/08 C	2881/08 C	2881/08 A	2881/08 B	2882/08 A1	2882/08 C	2914/08	2917/08	2939/08 B	2939/08 C	2939/08 D	3034/08 D	3034/08 C	3034/08 E

hgrd.	hgrd.	hgrd.	hgrd.	hgrd.	hgrd.	hgrd.	k.A.	hgrd.	hgrd.
hgrd.	mgrd.	mgrd.	hgrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.
hgrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.
mgrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	mgrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.
3208/07	0152/08	0738/08	1128/08	1232/08	1881/08	2228/08	2416/08	2431/08	2566/08
mgrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	ggrd.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
ggrd.	mgrd.	mgrd.	mgrd.	ggrd.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
3089/08 E	3111/08	3174/08 B	3233/08 A	3237/08 B	3252/08 B	3256/08 B	3303/08	3341/08 D	

E-Nr.	TGF- <i>β</i> -Expression	TGF- <b>β-Expression</b>	E-Nr.	TGF- <b>β-Expression</b>	TGF- <b>β-Expression</b>	TGF- <b>β-Expression</b>
	ŊŊ	AD		SN	AK	LKM
523/08 G	+	+	0085/00	+		+
1092/08 B	+	+	1994/00	+		
1210/08 B		I	2110/00	+		
1311/08 B	+	ı	1724/01	+	+	+
1362/08 A	+	+	1884/01	+		
1367/08	+	I	2261/01	+		
1450/08 C	+	+	0379/03	ı		
1581/08	+	ı	1201/03	+	+	
1672/08 D		I	1963/03	+		
1673/08 B		ı	1545/05	+		
1726/08 D	+	+	1801/05	+		
1726/08 F	+	I	2772/05	+		
1788/08	+	I	2802/05	+	+	1
1894/08 C	+	+	2890/05	+	I	1
1894/08 E	+	+	2928/05	+	1	1
1928/08 C	+	I	0868/06	+	+	1
2033/08	,	I	1512/06	÷	I	1
2048/08 C	+	+	1782/06	+	+	ı
2139/08	+	I	2238/06	÷	I	ı
2320/08 B	+		2275/06	+		÷
Tabelle 16: Erge	ebnisse der immunhiste	ochemischen Untersuc	chung von TGF-β. +	= positiv, - = negati	iv, k.A. = keine Anga	lbe

+	+						k.A.	+	+	1		+	,			k.A.		+		+	+
				+			k.A.					+				k.A.	+	1		+	+
+	+			+	+	+	k.A.		+	+	+	+	+		+	k.A.	+	+	+	+	+
2941/06	0031/07	0206/07	0517/07	0825/07	0833/07	0842/07	1160/07	1509/07	1822/07	1932/07	2243/07	2352/07	2509/07	2557/07	2609/07	2623/07	2747/07	2832/07	3208/07	0152/08	0738/08
		+	+											1		1		1	+	1	1
+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2398/08 D	2398/08 B	2432/08 B	2477/08 A	2477/08 C	2565/08 C	2881/08 C	2881/08 A	2881/08 B	2882/08 A1	2882/08 C	2914/08	2917/08	2939/08 B	2939/08 C	2939/08 D	3034/08 D	3034/08 C	3034/08 E	3089/08 E	3111/08	3174/08 B
ı		1	ı	ı	ı	ı															
-----------	-----------	-----------	-----------	---------	-----------	---------															
ı	-	ı	I	I	I	I															
+	+	+	I	1	I	+															
1128/08	1232/08	1881/08	2228/08	2416/08	2431/08	2566/08															
+	-		+		I																
+	+	+	I	+	+																
3233/08 A	3237/08 B	3252/08 B	3256/08 B	3303/08	3341/08 D																

E-Nr.	LTBP-4-Expression	LTBP-4-Expression	E-Nr.	LTBP-4-Expression	LTBP-4-Expression	LTBP-4-Expression
	NG	AD		NG	AK	LKM
523/08 G	+	+	0085/00	+		+
1092/08 B	+	ı	1994/00	+	1	
1210/08 B		+	2110/00	+		
1311/08 B	+	+	1724/01	+	+	
1362/08 A		I	1884/01	+		
1367/08	+	ı	2261/01	÷	1	
1450/08 C	+		0379/03			
1581/08			1201/03			+
1672/08 D		+	1963/03	÷	1	
1673/08 B			1545/05	+		
1726/08 D	+	+	1801/05	÷	1	
1726/08 F	k.A.	k.A.	2772/05	k.A.	k.A.	k.A.
1788/08	+	+	2802/05	+	I	ı
1894/08 C	I	+	2890/05		I	ı
1894/08 E	+	+	2928/05	+	+	+
1928/08 C	1	+	0868/06	+	1	
2033/08	+	I	1512/06		I	ı
2048/08 C	+	+	1782/06	+	I	ı
2139/08	+	I	2238/06	+	1	ı
2320/08 B	+	+	2275/06	+	+	+
Tabelle 17: E1	rgebnisse der immunhist	ochemischen Untersuc	chung von LTBP-4.	+ = positiv , - = neg	ativ, k.A. = keine An	gabe

+		•	+				k.A.		+			+			ı	k.A.	k.A.	ı			-
	+	1	+	+			k.A.		+			+				k.A.	k.A.	1	+		
+	ı	+	+	+	1	+	k.A.		+	+	+	+	ı	ı	+	k.A.	k.A.	+	+		+
2941/06	0031/07	0206/07	0517/07	0825/07	0833/07	0842/07	1160/07	1509/07	1822/07	1932/07	2243/07	2352/07	2509/07	2557/07	2609/07	2623/07	2747/07	2832/07	3208/07	0152/08	0738/08
+	1	+		+	+	+						ı	ı		ı	+	I	+	I	+	+
+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	ı	+	+	÷	+	+	-
2398/08 D	2398/08 B	2432/08 B	2477/08 A	2477/08 C	2565/08 C	2881/08 C	2881/08 A	2881/08 B	2882/08 A1	2882/08 C	2914/08	2917/08	2939/08 B	2939/08 C	2939/08 D	3034/08 D	3034/08 C	3034/08 E	3089/08 E	3111/08	3174/08 B

	+	+	I	I	I	•
ı	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	I	I	+
1128/08	1232/08	1881/08	2228/08	2416/08	2431/08	2566/08
+	+	1	I	I	+	
+	ı	+	I	I	+	
3233/08 A	3237/08 B	3252/08 B	3256/08 B	3303/08	3341/08 D	

n AK   p27-Expression LKM	-		-			-			+							•	•	•	1	1	+
p27-Expressio	1	1	1	+	+	1	I	1	+	I	1	1	1	1	1	+	1	1	1	1	+
p27-Expression NG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	1	+	+	+	+
E-Nr.	0085/00	1994/00	2110/00	1724/01	1884/01	2261/01	0379/03	1201/03	1963/03	1545/05	1801/05	2772/05	2802/05	2890/05	2928/05	0868/06	1512/06	1782/06	2238/06	2275/06	2941/06
p27-Expression AD	+	1	+	1	1	+	1	+	1	1	+	1					1	+	1	+	+
p27-Expression NG	+	+	+	1	+	+	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E-Nr.	523/08 G	1092/08 B	1210/08 B	1311/08 B	1362/08 A	1367/08	1450/08 C	1581/08	1672/08 D	1673/08 B	1726/08 D	1726/08 F	1788/08	1894/08 C	1894/08 E	1928/08 C	2033/08	2048/08 C	2139/08	2320/08 B	2398/08 D



		1				-			1				-				1				
			+					+					1			+					
		I	+			+			+	ı	ı		1	1		+	ı		ı	I	1
+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	÷	+	+	+	+	+	+	+
0031/07	0206/07	0517/07	0825/07	0833/07	0842/07	1160/07	1509/07	1822/07	1932/07	2243/07	2352/07	2509/07	2557/07	2609/07	2623/07	2747/07	2832/07	3208/07	0152/08	0738/08	1128/08
÷		1								I		÷			÷					1	1
+	÷	+	÷		÷	÷	÷	÷	+	+	+	÷	÷	÷	÷	÷	+	÷	+	1	+
2398/08 B	2432/08 B	2477/08 A	2477/08 C	2565/08 C	2881/08 C	2881/08 A	2881/08 B	2882/08 A1	2882/08 C	2914/08	2917/08	2939/08 B	2939/08 C	2939/08 D	3034/08 D	3034/08 C	3034/08 E	3089/08 E	3111/08	3174/08 B	3233/08 A

+	-	•	I	I	•
+	1	1	I	I	I
+	+	+	+	+	+
1232/08	1881/08	2228/08	2416/08	2431/08	2566/08
1	-	-	I	I	
+	+	+	+	+	
3237/08 B	3252/08 B	3256/08 B	3303/08	3341/08 D	

E-Nr.	RAD51-Expression	RAD51-Expression	E-Nr.	RAD51-Expression	RAD51-Expression	RAD51-Expression
	NG in %	AD in %		NG in %	AK in %	LKM in %
523/08 G	20,51	9,83	0085/00	k.A.	k.A.	k.A.
1092/08 B	20	26,56	1994/00	21,09	27,81	28,03
1210/08 B	38,08	22,73	2110/00	20,1	23,5	18,25
1311/08 B	22,6	40,33	1724/01	8,91	50,93	69,31
1362/08 A	15,15	36,33	1884/01	20,26	38,81	27,96
1367/08	12,08	7,78	2261/01	11,76	17,45	35,25
1450/08 C	4,42	25,19	0379/03	29,83	34,85	14,52
1581/08	22,95	11,88	1201/03	23,53	32,94	46,07
1672/08 D	7,88	38,75	1963/03	k.A.	k.A.	k.A.
1673/08 B	8,78	4,6	1545/05	24,24	38,33	3,81
1726/08 D	18,38	44,62	1801/05	15,42	32,95	45,7
1726/08 F	k.A.	k.A.	2772/05	k.A.	k.A.	k.A.
1788/08	33,29	34,32	2802/05	12,41	32,51	4,5
1894/08 C	9,17	50,84	2890/05	25,55	29,04	31,68
1894/08 E	35,65	53,41	2928/05	12,41	27,65	47,53
1928/08 C	42,22	20,68	0868/06	18,29	36,82	27,87
2033/08	14,46	18,31	1512/06	7,37	35,12	32,29
2048/08 C	8,55	38,72	1782/06	7,59	51,6	22,24
2139/08	18,49	12,36	2238/06	25,11	42,36	36,03
2320/08 B	8,57	36,73	2275/06	27,27	41,91	25,96
Tabelle 19: Erg	ebnisse der immunhis	tochemischen Untersu	chung von RAD51	. Anteil immunreaktiv	ver Zellen gemessen a	an der Gesamtzellzahl

in % angegeben.

29,95	k.A.	k.A.	k.A.	13,87	2,64	26,38	k.A.	44,32	11,97	0	8,81	31,29	38,98	4,26	19,06	k.A.	k.A.	22,92	26,52	25,56	49,3
27,14	k.A.	k.A.	k.A.	30,84	43,39	29,02	k.A.	36,07	23,84	0	18,24	35,78	37,85	33,48	25,79	k.A.	k.A.	42,24	47,04	33,74	47,02
9,35	k.A.	k.A.	k.A.	14,6	17,19	3,24	k.A.	34	25	0	22,26	20,6	23,84	14,36	25,91	k.A.	k.A.	25,14	18,13	31,18	11,96
2941/06	0031/07	0206/07	0517/07	0825/07	0833/07	0842/07	1160/07	1509/07	1822/07	1932/07	2243/07	2352/07	2509/07	2557/07	2609/07	2623/07	2747/07	2832/07	3208/07	0152/08	0738/08
44,55	15,19	16,72	32,27	4,71	16,49	10,8	21,01	26,48	16,22	22,64	25,36	28,64	27,66	24,69	49,47	k.A.	35,36	34,9	31,88	47,62	46,42
15,71	38,83	28,56	28,94	19,33	18,65	16,27	31,2	41,42	32,07	24,9	19,87	20,97	30,43	40	31,92	k.A.	12,81	11,54	36,66	36,99	11,87
2398/08 D	2398/08 B	2432/08 B	2477/08 A	2477/08 C	2565/08 C	2881/08 C	2881/08 A	2881/08 B	2882/08 A1	2882/08 C	2914/08	2917/08	2939/08 B	2939/08 C	2939/08 D	3034/08 D	3034/08 C	3034/08 E	3089/08 E	3111/08	3174/08 B

·						
33,83	8,17	29,51	10,58	21,36	28,65	21,29
36,38	53,85	44,18	29,92	22,57	42,39	26,63
6,41	21,05	9,63	21	9,49	32,33	24,73
1128/08	1232/08	1881/08	2228/08	2416/08	2431/08	2566/08
33,61	23,56	17,95	28,53	30,65	28,4	
15,79	17,96	26,74	21,51	5,82	11,02	
3233/08 A	3237/08 B	3252/08 B	3256/08 B	3303/08	3341/08 D	

## 13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Klopfleisch für die Überlassung des interessanten Themas und für die Hilfestellung, der damit dieses Projekt überhaupt erst möglich gemacht hat. Mit seinem fachlichen Wissen und seinen aufbauenden Worten stand er mir jederzeit zur Seite. Danke.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D. für die Ermöglichung der Anfertigung dieser Arbeit in seinem Institut und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön an Frau Michaela Dauer, die mir insbesondere im immunhistochemischen Labor mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei meinen Mitdoktoranten Ana Schleicher, Nikola Heblinski, Stephi Plog und Melanie Bothe möchte ich mich für die lustigen Stunden, die aufbauenden Worte sowie für das Einbringen neuer Ideen bedanken.

Meine Eltern danke ich von ganzem Herzen, die mich immer unterstützt haben und ohne die ich nie soweit gekommen wäre.

Großer Dank auch an meine Schwester und ihrem Mann, die mich nicht nur durch das Korrekturlesen, sondern auch emotional tatkräftig unterstützt haben.

Meinem Bruder und seiner Familie danke ich für die Zeit in New York, in der ich Kraft tanken konnte.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Opa für die finanzielle Unterstützung, der somit zu einem großen Teil zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Originalartikel:

- Klopfleisch R., Schütze M., Linzmann H. und Gruber A.D. "Increased Derlin-1 Expression in Metastases of Canine Mammary Adenocarcinomas." Journal of Comparative Pathology 142(1):79-83, 2009.
- Klopfleisch R., Schütze M. und Gruber A.D.
  "Loss of p27 Expression in Canine Mammary Tumors and their Metastases."
  Research in Veterinary Science 88(2):300-303, 2009.
- Klopfleisch R., Schütze M. und Gruber A.D.
  "Downregulation of transforming growth factor beta (TGFbeta) and latent TGFbeta binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours." Veterinary Journal, doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.014.
- Klopfleisch R., Schütze M. und Gruber A.D.
  "RAD51 Protein Expression is Increased in Canine Mammary Adenocarcinomas." Veterinary Pathology 47(1):98-101, 2010.

## Vorträge:

 Schütze M., Gruber A.D. und Klopfleisch R. (2009). "Malignitätsassozierte RAD51- und Derlin-1-Expression in metastasierenden caninen Mammatumoren."

52. Tagung der Fachgruppe Pathologie in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, 07.-08. März 2009

## 14 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Königs Wusterhausen, den 1.07.2010

Mareice Schütze