



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

## „Genetische Alterationen in der Atrophie und im Karzinom der Prostata“

verfasst von / submitted by

Seval Yildiz-Sezer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 190 445 406

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Lehramtsstudium UniStG  
UF Biologie und Umweltkunde UniStG  
UF Mathematik UniStG

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Mag. Dr. Sylvia Kirchengast

## **Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich bei allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit in verschiedenster Art und Weise unterstützt haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Mag. Mag. Dr. Sylvia Kirchengast für die Betreuung der Diplomarbeit, für die gewährte Freiheit, ein selbstgewähltes Thema zu behandeln.

Weiters möchte ich mich bei Prof. Mikuz, Prof. Verdorfer, Prof. Rogatsch und Dr. Schäfer für die Unterstützung während der Forschungsarbeit bedanken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Ruth Steindling für das Korrigieren der Diplomarbeit, bei Nihal Net für die Korrektur und das fachliche Überarbeiten der Texte.

Selen, Mercan und Lena möchte ich herzlich dafür danken, dass Sie mir, durch die liebevolle Betreuung meines Sohnes, den Rücken und den Kopf freigehalten haben.

Für die stetige Hilfsbereitschaft, aufmunternde Unterstützung und die wunderbare gemeinsame Zeit während des Studiums möchte ich mich bei Christa Perner herzlichst bedanken. Bei Desiree Šubik bedanke ich mich für die zahlreichen Ideen, Tipps und schönen Momente die ich während gemeinsamen Lernstunden genießen durfte. Weiters möchte ich mich bei Cem Sevim bedanken, der mich im Studium stets unterstützt und begleitet hat.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, Geschwistern Serpil, Sibel und Sevil, meinen Zieheltern Erika und Heinz und Geschwistern Angelika, Christine und Thomas sowie den Kindern Burcu, Ogulcan, Lara, Denis, Melis, Alina, Santino, Angelina, Verena, Tamara und Leo für deren liebevolle Unterstützung.

Bei meinem Ersin möchte ich mich für die unendlich liebevolle Unterstützung ganz herzlich bedanken. Ohne ihn hätte ich es nicht gewagt den zweiten Bildungsweg einzuschlagen.

Mein größter Dank gebührt meinen Söhnen Güney und Aren, deren strahlende Augen die unerschöpfliche Quelle der Kraft und Freude meines Lebens sind.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	5
Abstract .....	6
1. Einführung .....	7
1.1. Prostatakarzinom .....	7
1.1.1. Epidemiologie.....	7
1.1.2. TNM Klassifikation und der Gleason Score .....	9
1.1.3. Diagnose.....	12
1.1.4. Risikofaktoren .....	13
1.1.5. Die Genetik des Prostatatumors.....	17
1.2. Atrophie der Prostata .....	22
1.2.1. Definition .....	22
1.2.2. Klassifikation .....	22
1.2.3. Epidemiologie.....	24
1.2.4. Immunhistochemische Untersuchungen.....	25
1.2.3. Genetische Veränderungen in atrophen Läsionen.....	28
1.3. Das Mehrstufen- Progressions- Model .....	29
1.4. Fragestellung .....	30
2. Material und Methoden.....	31
2.1. Material.....	31
2.1.1. Gewebeproben für die FISH Analyse .....	31
2.1.2. Gewebeproben für die CGH-Analyse .....	32
2.2. Methoden .....	32
2.2.1 Diagnose der Gewebeläsionen .....	32
2.2.2. Tissue Micro Array .....	33
2.2.3. Fluoreszenz in Situ Hybridisierung .....	34
2.2.4. Vergleichende Genomische Hybridisierung.....	39
2.2.5. Statistik .....	42
3. Ergebnisse .....	43
3.1. Veränderungen an Chromosom 8 .....	43
3.1.1. Verlust 8p22.....	43
3.1.2. Zugewinn 8q24.....	44

3.1.3.	Monosomie 8.....	45
3.1.4.	Zugewinn Chromosom 8 .....	45
3.1.5.	Disomie 8 .....	46
3.1.6.	Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24 .....	46
3.1.7.	Gesamtvergleich der untersuchten Läsionen .....	49
3.2.	Chromosom X .....	50
3.2.1.	CGH-Analyse .....	50
3.2.2.	FISH-Analyse .....	50
4.	Diskussion.....	53
4.1.	Genetische Instabilität der Prostataatrophie .....	53
4.2.	Prostataatrophie als Vorläufer von PIN und Karzinom.....	55
4.3.	Offene Fragen .....	56
5.	Literaturverzeichnis .....	58

## Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom gilt als eines der wichtigsten Tumorerkrankung und zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern. Die Inzidenzrate ist, nach einem starken Anstieg in den 1990er Jahren, neulich gesunken. Dennoch ist in den USA und in Europa das Prostatakarzinom eines der wichtigsten Erkrankungen älterer Männer. Entzündungen und damit verbundener oxidativer Stress zählen neben familiärer Prädisposition, Ernährung und Arteriosklerose zu den Risikofaktoren. Das Prostatakarzinom ist eine multifokale Erkrankung, die durch mehrere, voneinander unabhängig auftretende Adenokarzinome charakterisiert ist. Die Prostatistische Intraepitheliale Neoplasie (PIN) wird als Vorläufer des Prostatakarzinoms bezeichnet, erklärt jedoch die Tumorentstehung nicht vollständig. Die Prostataatrophie, vor allem die Atrophie mit der Hyperplasie der Basalzellen, wird als Vorstufe von der PIN und dem Adenokarzinom diskutiert. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Atrophie-Läsionen erhöhte Proliferation und geringere Apoptoseraten vorweisen. Die Atrophie ist häufig in der Peripheren Zone, dem von Adenokarzinomen bevorzugten Teil der Prostata, lokalisiert und assoziiert meistens mit Entzündungen. Epigenetische Untersuchungen zeigen, dass im Prostatakarzinom auftretende Ereignisse wie GSTP1-Insel-Hypermethylierung, p53-Mutationen, CAG-Repeat-Polymorphismus des AR-Gens in der Prostataatrophie vorkommen. Es wird behauptet, dass oxidativer Stress, bedingt durch Entzündungen in der Prostataatrophie, zu genetischen Veränderungen in den Epithelzellen und zur neoplastischen Transformation führt.

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt um genetischen Veränderungen in der Prostataatrophie zu untersuchen und mit den Alterationen die im Normalgewebe, in der PIN und im Karzinom vorkommen, zu vergleichen.

Mittels FISH-Analysen wurden bei 50 Patienten entsprechende Gewebeläsionen nach Chromosom 8 Alterationen in Form von Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24 durchsucht. Ein gradueller Anstieg in Anzahl der Kerne mit Verlust 8p22 wurde im Normalgewebe, in der Atrophie, in der PIN und im Karzinom vorgefunden. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Kerne mit Zugewinn 8q24 konnte durch den Vergleich der Atrophie mit dem Normalgewebe und dem Karzinom festgestellt werden. Um genetische Veränderungen am gesamten Genom der Prostataatrophie zu untersuchen, wurden CGH-Analysen durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten in 70 % der Atrophie-Läsionen einen Zugewinn von Chromosom X. Die FISH-Methode wurde für die Verifizierung der CGH-Ergebnisse und für den Vergleich der Chromosom X Aberrationen in gepaarten Karzinom-Läsionen angewendet.

Die genetische Instabilität der Prostataatrophie konnte anhand der detektierten Alterationen an Chromosom 8 und Chromosom X gezeigt werden.

## **Abstract**

Prostate cancer is one of the most frequently diagnosed tumours and the second leading cause of cancer deaths among men. The incidence rate has dropped recently, after a strong increase in the 1990s. Nevertheless, in the US and in Europe is prostate cancer the major disease of aging men. Inflammation and associated oxidative stress are other risk factors in addition to familial predisposition, nutrition and arteriosclerosis. Prostate cancer is a multifocal disease characterized by multiple, independently occurring adenocarcinomas. Prostate Intraepithelial Neoplasia (PIN) has been proposed as a precursor of prostate cancer, but the tumour development is not completely described. Prostate atrophy, especially atrophy with hyperplasia of basal cell, has been indicated as a precursor to PIN and adenocarcinoma. Immunohistochemical studies detected increased proliferation and lower rates of apoptosis in atrophic lesions. Prostatic atrophy is often located in the peripheral zone of the prostate, the preferred site of adenocarcinoma and is frequently associated with inflammation.

Epigenetic studies demonstrated common events in prostate cancer such as GSTP1 island hypermethylation, p53 mutations, CAG repeat polymorphism of the AR gene in atrophic lesions. It has been assumed that oxidative stress caused by inflammation in the prostatic atrophy leads to genetic changes in the epithelial cells and to neoplastic transformation.

The present work was carried out to investigate genetic changes in atrophic lesions and to compare them with alterations occurring in normal tissue, in PIN and in carcinoma.

Using FISH analyses, chromosome 8 alterations, such as loss of 8p22 and gain of 8q24 were investigated in prostate tissues of 50 patients. A gradual increase in number of nuclei with loss of 8p22 was found in normal tissue, atrophy, PIN and carcinoma. The comparison of atrophy with normal tissue and carcinoma showed a significant difference in the number of nuclei with gain of 8q24. CGH analyses were performed to investigate genetic changes in the entire genome of prostatic atrophy. Gain of Chromosome X was found in 70 % of examined atrophic lesions. Verification of the CGH results and comparison with chromosome X aberrations in paired carcinoma lesions was performed using FISH analysis.

The genetic instability of prostatic atrophy was demonstrated by the detected alterations in chromosome 8 and chromosome X.

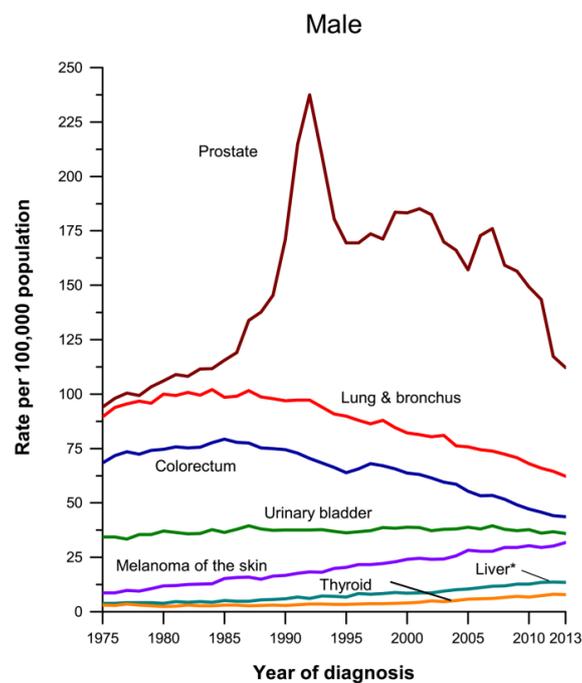
# 1. Einführung

## 1.1. Prostatakarzinom

### 1.1.1. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist nach dem Lungenkrebs das am häufigsten diagnostizierte Karzinom. So kam es 2008 weltweit zu 903.500 Neuerkrankungen und 258.400 Todesfällen. Dies machte 14 % aller Karzinome und 6 % aller Tumor bedingten Todesfälle aus. Die Inzident variiert sehr stark, mehr als das 25-Fache weltweit und ist am größten in Europa und der USA [Ferlay et al. 2010]. So wurden für 2017, in den USA, 161.360 Neudiagnosen und 26.730 Todesfälle erwartet. [Siegel et al. 2017]. Die Inzidenzraten in Europa sind sehr heterogen und variieren in den 40 untersuchten Europäischen Staaten um mehr als das 7-Fache (25-193 pro 100.000). Die höchsten Inzidenzraten zeigten sich in Nord- und Westeuropa und die niedrigsten in Zentral- und Osteuropa [Ferlay et al. 2013].

Die Inzidenzrate erhöhte stark in den 1990er Jahren sich sehr, setzte sich dann leicht fort [Jemal et al. 2003]. Hauptgrund war die Einführung des PSA-Tests und die damit verbundene vermehrte Detektion der Prostatakarzinome in sehr frühen Stadien. Kürzlich sanken jedoch die Inzidenzraten (Abb. 1), bis auf die Hälfte [Siegel et al 2016]. Dies wiederum wird mit der Tatsache in Verbindung gebracht, dass die PSA Testung wegen hoher Überdiagnosen, seit 2010 stark gesunken ist [Hayes und Barry 2014; Draisma et al 2009].



**Abbildung 1:** Tumorerkrankungen der Männer in den USA: Trends in Inzidenz (1975 bis 2013) und Todesrate (1975 bis 2014).

Die Prävalenz des Prostatakarzinoms steigt mit zunehmendem Alter. Die Wahrscheinlichkeit diagnostiziert zu werden ist für Männer unter 40 Jahren 1 zu 19.299, 1 zu 45 zwischen 40 und 59 Jahren, und 1 zu 7 im Alter von 60 bis 79 Jahren. Weltweit wurden drei Viertel aller Prostatakarzinome bei Patienten im Alter von 65 oder darüber diagnostiziert [Lutz et al. 2003]. Alle Männer mit zirkulierenden Androgenen können, sofern sie lange genug leben, zumindest mikroskopisch nachweisbare Tumor-Läsionen entwickeln [Bostwick et al. 2004].

Prostatakarzinom ist eine multifokale Erkrankung die dadurch gekennzeichnet ist, dass mehrere Adenokarzinome unabhängig voneinander entstehen [Arora et al. 2004]. Die Mehrzahl der diagnostizierten Prostatakarzinome (68-75%) sind, wie die Prostatitis und die Vorläsionen, in der peripheren Zone, im äußeren Teil der Prostata lokalisiert. Nur 4 bis 8 % der Tumore entstehen in der Zentral Zone und 20 bis 24 % in der Transitionalzone [McNeal et al. 1988].

Ein anfangs androgen-abhängiger, organ-begrenzter Tumor entwickelt sich in späteren Stadien in ein hoch invasives, androgen-unabhängiges metastasierendes Karzinom [Abate-Shen & Shen 2000]. Die Prostata Intraepitheliale Neoplasie (engl. Prostatic Intraepithelial Neoplasia; PIN), vor allem des höheren Grades (HG PIN, High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia) wurde mehrmals als der Vorläufer des Prostatakarzinoms der Peripheren Zone postuliert. Dies basiert auf der "zonalen kolo-kalisierung", den morphologischen Transitionen und den molekulargenetischen Ähnlichkeiten zwischen PIN und dem Adenokarzinom [McNeal JE. und Bostwick DG. 1986; McNeal et al. 1991; Bostwick et al. 1996]. Der Mechanismus, der die Progression von PIN zum Prostatatumor beschreibt, ist noch ungeklärt.

Zur Behandlung des metastasierenden Prostatakarzinoms wird bei den meisten Patienten eine Androgenentzugstherapie, mit dem Ziel der Reduktion der hormonabhängigen Tumorzellen, durchgeführt. Anfangs sprechen ungefähr 70 bis 80 % der Patienten auf diese Therapie an. In späteren Stadien jedoch kann eine hormon- refraktäre, hoch aggressive Form mit Metastasen und schlechter Prognose entstehen [Gittes 1991].

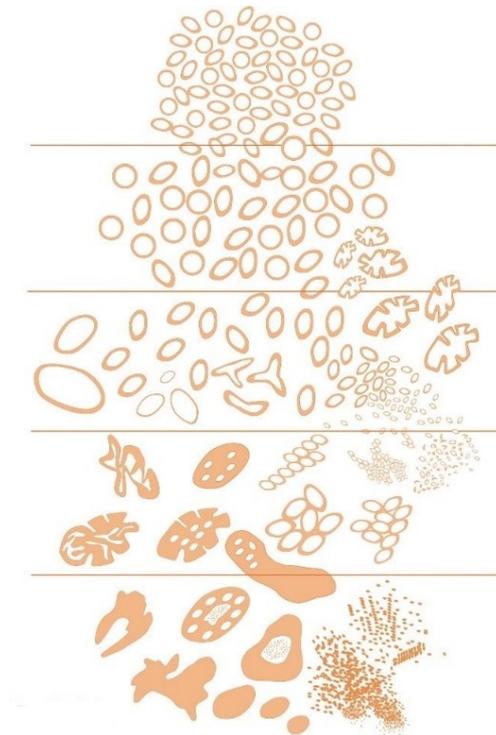
Die Eigenschaft der Tumorzellen entfernte Organe zu befallen, ist die Hauptursache Krebs induzierten Todes. Die regionalen Lymphknoten und das Knochensystem sind die am meisten befallenen Organe. Mehr als 70 % der Patienten, die an Prostatakarzinom verstarben, zeigten Knochenmetastasen [Zettler 1990].

### 1.1.2. TNM Klassifikation und der Gleason Score

Die Heterogenität und die multifokale Natur der Prostatakarzinom-Läsionen führen zu erheblichen Schwierigkeiten in der Diagnose. Zusätzlich zur TNM Klassifikation, die als Standard dient, wurde von Gleason ein weiteres Einstufungssystem, basierend auf die histologischen Strukturen in H&E gefärbten Prostatagewebe Schnitten [Gleason 1992] eingeführt.

Das TNM Einstufungssystem (Tabelle 1) basiert auf der Lokalisierung und der Größe des Tumors [Brierley et al. 2017]. Bewertet werden das lokale Tumorwachstum (T), die regionalen Lymphknoten (N) und die Fernmetastasen (M).

Im Gleason-Score System werden fünf histologische Drüsenformationen (Abbildung 3) zur Erstellung eines gesamten Tumorgrades, welcher zwischen 2 und 10 variieren kann, verwendet. Der Gleason-Score vereint primäre prädominante histologische Muster mit sekundären Mustern. Ein höherer Gleason Grad weist auf ein fortgeschrittenes Karzinom hin.



**Abbildung 2:** Die histologischen Grade des Gleason Score Systems [Humphrey et al. 2016].

Gleason-Muster 1 ist ein seltenes Muster mit gut differenzierten, runden, relativ gleichmäßigen mittelgroßen Azini. Gleason-Grad 2 ist gekennzeichnet durch eine Zunahme in der Variabilität der Drüsengröße und Form. Die mittelgroßen Azini liegen durch das dazwischenliegende Stroma weiter voneinander entfernt. Gleason Grad 3 wird am häufigsten diagnostiziert und zeigt höhere Variabilität der Drüsen in Größe und Form. Gleason Grad 4 ist ein hoch-grad, gering differenziertes Karzinom mit Infiltration in das umgebene Gewebe und umfasst auch kribiforme und glomerulide Drüsen. Gleason Grad 5 ist das am geringsten differenzierte Muster und umfasst unregelmäßige Zellen ohne erkennbaren Drüsenstrukturen [Gleason 1992; Epstein et al. 2016; Moch et al. 2016].

Der Gleason-Score wird aus der Summe der beider, primärer und sekundärer Muster berechnet. Neulich wurde ein neues Grading-System, auf der Basis des Gleason-Score Systems eingeführt [Pierorazio et al. 2013; Epstein et al. 2016 b]. So werden die ermittelten Gleason- Score- Werte in fünf verschiedene Gruppen unterteilt (Tabelle 2).

<b>T-Primary tumour</b>	
<b>TX</b>	Primary tumour cannot be assessed
<b>T0</b>	No evidence of primary tumour
<b>T1</b>	Clinically inapparent tumour that is not palpable
T1a	Tumour incidental histological finding in 5% or less of tissue resected
T1b	Tumour incidental histological finding in more than 5% of tissue resected
T1c	Tumour identified by needle biopsy (e.g., because of elevated PSA)
<b>T2</b>	Tumour that is palpable and confined within prostate
T2a	Tumour involves one half of one lobe or less
T2b	Tumour involves more than half of one lobe, but not both lobes
T2c	Tumour involves both lobes
<b>T3</b>	Tumour extends through the prostatic capsule
T3a	Extracapsular extension (unilateral or bilateral) including microscopic bladder neck involvement
T3b	Tumour invades seminal vesicle(s)
<b>T4</b>	Tumour is fixed or invades adjacent structures other than seminal vesicles: external sphincter, rectum, levator muscles, and/or pelvic wall
<b>N- Regional Lymph Nodes</b>	
<b>NX</b>	Regional lymph nodes cannot be assessed
<b>N0</b>	No regional lymph node metastasis
<b>N1</b>	Regional lymph node metastasis
<b>M-Distant Metastasis</b>	
<b>M0</b>	No distant metastasis
<b>M1</b>	Distant metastasis
M1a	Non regional lymph node(s)
M1b	Bone(s)
M1c	Other site(s)

**Tabelle 1:** TNM Klassifikation [Brierley et al. 2017].

Grade Group	Gleason Score	Gleason Pattern
1	≤ 6	≤ 3 + 3
2	7	3 + 4
3	7	4 + 3
4	8	4 + 4
5	9-10	4+5, 5 + 4, 5 + 5

**Tabelle 2:** Grad Gruppen basierend auf den Gleason Score und Gleason Muster [Epstein et al. 2016]

### 1.1.3. Diagnose

Der Serum PSA-Test (Prostata spezifisches Antigen) und die Rektaluntersuchung gelten als der Goldstandard in der Diagnose des Prostatakarzinoms. Der PSA Test aus dem Blut ist schnell und unkompliziert und führt zur Früherkennung [Catalona 1994].

Beim PSA handelt es sich um eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 34.000 Dalton. In den Epithelzellen der Ductus und Azini produziert, wird das PSA in das prostatiche Duktalsystem abgegeben und kommt im Urin, Im Blut und in der Samenflüssigkeit vor [Vessella et al. 1992].

Eine Korrelation zwischen dem Alter und dem Gesamt-PSA-Wert wurde festgestellt [Anderson et al. 1995]. Für die Diagnostik werden daher altersbezogene Werte gesunder Männer als Obergrenzen verwendet (Tabelle 3). Bei den meisten Patienten mit Prostatakarzinom liegt der Der PSA-Wert über der festgelegten Grenze von 4.0 ng/ml.

Age	PSA Value
< 50	<2.5 ng/ml
<60	<3.5 ng/ml
<70	<4.5 ng/ml
<80	<6.5 ng/ml

**Tabelle 3:** Age related PSA values of healthy males [Anderson 1995].

Die Palpation der Prostata ist eine wichtige Untersuchung zur Detektion von Prostatakrebs und wird prinzipiell als erster Schritt für die Diagnose angewendet. Für eine weitere Abklärung werden bei Bedarf weitere Methoden wie Ultraschall oder Nadelbiopsien herangezogen. [Hammerer und Huland 1994; Melchior und Brawer 1996].

#### **1.1.4. Risikofaktoren**

Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine Aussage bezüglich Auslöser oder Grund für Prostatakarzinom nicht möglich. Dennoch gelten familiäre Disposition, Hormone, Ernährung, Arteriosklerose, Alter und Entzündungen als Faktoren, die das Risiko an Prostatakarzinom zu erkranken, erhöhen.

##### **1.1.4.1. Familiäre Prädisposition**

Das Prostatakarzinom assoziiert stark mit einer positiven Familienanamnese. So haben Männer ein 5 bis 11-Fach höheres Risiko an Prostatakrebs zu erkranken, wenn bereits zwei oder mehr Verwandte ersten Grades daran erkrankt sind. Das Risiko korreliert mit der Anzahl an betroffenen Familienmitgliedern und mit dem Verwandtschaftsgrad [Steinberg et al. 1990].

In einer Studie mit skandinavischen Zwillingen wurde eine größere Übereinstimmung bezüglich der Krebsrate unter eineiigen Zwillingen festgestellt. Erklärt werden die Ergebnisse durch den genetischen Faktor, der eine Rolle spielt [Gronberg et al. 1994].

Hereditärer Prostatakrebs macht ca. 5 bis 10 % aller Prostatakarzinomfälle aus [Standford und Ostrander 2001]. Bei Diagnosen vor dem 55. Lebensjahr handelt es sich in 43 % der Fälle um den erblichen Prostatatumor [Carter et al. 1992]. Dieser ist durch Folgendes charakterisiert [Standford und Ostrander 2001]:

- 1) Drei oder mehr Verwandte ersten Grades mit Prostatakrebs
- 2) Drei sukzessive Generationen mit Prostatakrebs
- 3) Zwei Brüder mit Prostatakrebs, deren Erkrankung vor dem 55. Lebensjahr diagnostiziert wurde

##### **1.1.4.2. Hormone**

Für Wachstum und Funktion der Prostata, sind endogene Hormone wie die Androgene essentiell [Nomura und Kolonel 1991]. Eine über mehrere Jahrzehnte andauernde Erhöhung des Testosteron- und Dihydrotestosteronspiegels wird mit einem höheren Risiko an

Prostatakarzinom zu erkranken in Verbindung gebracht. [Henderson et al. 1982; Nomura et al. 1996]. Die Aktivität der 5-Alpha-Reduktase ist assoziiert mit einem erhöhten Tumor Risiko [Ross et al. 1992]. Eine Kohortenstudie zeigte eine positive Korrelation zwischen Prostatakarzinom und dem Testosteron Spiegel im Blut nur bei zusätzlich niedrigen Werten von SHBG (Sexual Hormon bindendes Globulin). Die Frequenz reduziert sich mit einer Zunahme der SHBG-Konzentration. Dies deutet darauf hin, dass nur Androgene biologisch wichtig sind, die nicht an SHBG gebunden vorliegen [Gann et al. 1996].

Die Hemmung der testikulären Androgenproduktion stellt die primäre Behandlung von Prostatakarzinomen dar. Die Androgenentzugstherapie reduziert den Testosteronspiegel im Blut um 95% [Auclerc et al. 2000].

Die Inzidenz der Erkrankung ist geringer unter Männern, die an Zirrhose leiden. Dies ist begründet durch die höheren Östrogene und den niedrigeren Testosteronspiegel. [Giovannucci 2001]. Zudem werden hohe Konzentrationen an Insulin like Growth Faktor 1 (IGF1) mit einem erhöhten Risiko an Prostatakrebs in Verbindung gebracht. Der Effekt von IGF- 1 wird vermutlich durch niedrige IGF bindende Proteinkonzentrationen (IGFBP-3), dem wichtigsten Bindungsprotein im Kreislauf, erhöht. In vitro- und in vivo-Untersuchungen zeigten, dass die Zugabe von IGF-1 bei Ratten zum Wachstum der Prostata führt. In transgenen Mausmodellen geht die Tumorentwicklung mit erhöhter IGF-1 Expression einher [Pollak 2001].

#### **1.1.4.3. Ernährung**

Untersuchungen in mehreren Ländern zeigen eine starke Assoziation zwischen der Inzidenz und/oder der Mortalitätsrate von Prostatakarzinom und dem Fettkonsum [Armstrong and Doll 1975]. Nahrung mit hohen Anteilen an Fleisch und gesättigten Fetten korrelieren mit erhöhte Risiko an Prostatakrebs zu erkranken [Whittemore et al. 1995; Heshmat et al. 1985; Hayes et al. 1999; Ramon et al. 2000; Michaud et al. 2001]. Erklärungen in welcher Weise der Fettkonsum das Risiko erhöht, sind allerdings unklar. Unterschiedliche Mechanismen, wie die Veränderungen des Hormonprofils [Bishop et al. 1988], der Effekt von Fettmetaboliten als DNA- oder Proteinreaktive Substanzen [Hietanen et al. 1994] oder eine Erhöhung des oxidativen Stresses durch Fette in der Nahrung [Ho und Baxter 1997] werden diskutiert.

In weiterer Folge werden Antioxidantien in der Nahrung, solche wie Selen, Vitamin E und Lycopin, mit einem reduzierten Risiko an Prostatakrebs zu erkranken in Verbindung gebracht [Giovannucci 2001; Clark et al. 1998; Eichholzer et al. 1996]. Der Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Tomaten und tomatenhaltigen Produkten in Bezug zur Entwicklung von Prostatakrebs wurde von Giovannucci untersucht [Giovannucci 2001]. Die inverse Assoziation von Prostatakarzinom und Tomaten und deren Produkte wird durch die vorhandenen

Lycopene und Carotinoide in Tomaten und deren hohe antioxidative Wirkung erklärt. Zudem zeigten Untersuchungen an Rauchern, dass durch die Einnahme von Vitamin E die durch Prostata-Tumor verursachte Mortalität signifikant reduziert wird [Eichholzer et al. 1996].

#### **1.1.4.4. Arteriosklerose**

Epidemiologische Daten zeigen, dass die Prävalenz der koronaren Herzerkrankungen und des Prostatakarzinoms mit der Arteriosklerose assoziieren. Eine Fallkontrollstudie berichtet erhöhtes Risiko für ein Prostatakarzinom bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Der Zusammenhang wird durch gemeinsame Risikofaktoren, die in beiden Krankheiten eine Rolle spielen, wie oxidativer Stress, Ernährung und Sexual Hormonen erklärt [Neugut et al. 1998].

Zudem wurden morphometrische Untersuchungen der lokalen arteriosklerotischen Veränderungen an Prostataproben mit und ohne Tumorkommen durchgeführt. Für die Bewertung der Arteriosklerose wurde das Intima-Media Verhältnis (Intima-Media-Ration, IMR) in den Arterien der Prostatakapsel herangezogen. Ein IMR > 1 deutete auf das Vorhandensein von Arteriosklerose in Blutgefäßen hin und wurde in 33 % der Proben mit Prostata-Tumor festgestellt. Im Vergleich dazu zeigten nur in 17 % der tumorfreen Proben eine Arteriosklerose in den Blutgefäßen. Dieser signifikante Unterschied bestätigt die Annahme, dass Patienten mit lokaler Arteriosklerose ein höheres Risiko an Prostatakarzinom zu erkranken vorweisen [Hager et al. 2007].

#### **1.1.4.5. Alter**

Das Prostatakarzinom gilt als die Erkrankung des "älteren Mannes" und die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter erheblich. Nahezu 75 % der klinisch detektierten Fälle wurden bei Männern im Alter von 50 bis 70 Jahren diagnostiziert [Brawley et al. 1998]. Nur 0,1 % der Prostata-Tumoren werden bei Patienten unter 40 Jahren vorgefunden [Parker et al. 1996]. Die Frequenz der Inzidenz erhöht sich auf über 90 % im Alter von 90 Jahren. Autopsiebefunde zeigten kleine prostatistischen Adenokarzinome bei bis zu 29 % der Männer zwischen 30 und 40 Jahren und in 64 % der Männer im Alter von 60 bis 70 Jahren [Sakr et al. 1994].

Im alternden Gewebe kommt es zu einer fortschreitenden Akkumulation von DNA Adukten und einer Zunahme von DNA Brüchen. Es wird vermutet, dass diese altersabhängigen Veränderungen durch den oxidativen Stress verursacht werden. Reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reaktive Oxidative Species, ROS) und freie Radikale entstehen während natürlicher metabolischer Prozesse. Diese hoch reaktiven Produkte können die DNA, Makromoleküle und Zellen beschädigen. Die ROS dürften die oxidative Modifikation von Proteinen und Enzymen katalysieren, die in die DNA-Reparatur involviert sind. Die Zellen in jungen und gesunden

Individuen sind mit adäquaten antioxidativen Verteidigungsmechanismen ausgestattet, die vor freien Radikalen und ROS schützen.

In den meisten „alternden“ Geweben wird eine Abnahme des ROS Detoxifikationsenzyme beobachtet. Der Alterungsprozess beeinflusst den oxidativen Stress, der wiederum auf die Tumorgenese und Progression des Prostatakarzinoms wirkt [Sohal und Weindruch 1996].

#### **1.1.4.6. Entzündungen**

Ein erhöhtes Risiko an Prostatakrebs zu erkranken wurde mit symptomatischer Prostatitis und sexuell übertragbaren Krankheit in Verbindung gebracht. Eine retrospektive Studie zeigte, dass das Risiko unter Männern mit Gonorrhoe oder Syphilis in der Krankengeschichte erhöht war. Weit höher lag das Risiko an Prostatakrebs unter Männern die in der Vergangenheit drei oder mehrere Episoden an Gonorrhoe erlitten [Strickler und Goedert 2001; Hayes et al. 2000].

Einige Studien zeigen eine positive Assoziation zu HPV-Serotypen (Human Papilloma Viren) und Prostatakrebs [Hisada et al. 2000]. Im Tumorgewebe und auch im benachbarten Normalgewebe wurden HPV nachgewiesen [Carozzi 2004]. Das Epstein Barr Virus wurde mittels Analysen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in manchen Prostatatumoren vorgefunden [Grinstein et al. 2002].

Mehrere Wissenschaftler gehen davon aus, dass eine lang anhaltende chronische Entzündung, welche durch die Akkumulation von chronischen inflammatorischen Zellinfiltraten in die Prostata charakterisiert ist, mit dem Prostatakarzinom assoziiert sei [Konig et al. 2004; Nelson et al. 2004; Palapattu et al. 2005]. Virale Infektionen, unausgewogene Ernährung und hohe zirkulierende Testosteron-Konzentrationen sind mögliche ätiologische Faktoren, die in der Entstehung der chronischen Prostataentzündungen eine Rolle spielen [Fleshnar und Klotz 1998].

Eine Follow-up Studie untersuchte an Nadelbiopsien den klinischen Ausgang nach fünf Jahren und verglich die Daten von Patienten mit und ohne chronischer Entzündung in der Prostata. So wurde festgestellt, dass 20 % der Patienten mit chronischer Inflammation in der Initialbiopsie an Prostatakarzinom erkrankten während bei nur 6 % der Patienten ohne Entzündungen der Tumor detektiert wurde [MacLennan et al. 2006].

Tiermodelle legen nahe, dass Nicht-Steroidale-Anti-Entzündliche Medikamente (engl. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAID) die Inzidenz und auch die Progression des Prostatakarzinoms vermindern [Wechter et al. 2000]. Beim Menschen wurde die tägliche Einnahme von rezeptfreien NSAIDs wie Aspirin oder Ibuprofen mit einer 66 %igen Reduktion von Prostatakrebs in Verbindung gebracht [Nelson und Harris 2000]. Der protektive Effekt von

Paracetamol bei längerer Einnahme zeigt, dass NSAIDs einen gewissen Platz in der Chemoprävention von Prostatakrebs einnehmen können [Garcia et al. 2004].

Eine wichtige Rolle in der Progression des Tumorgewebes wird den Prostaglandinen zugesprochen [Sjodahl 2001; Thun et al. 2002]. Das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2), verantwortlich für die Produktion von verschiedenen inflammatorischen Prostaglandinen, ist im Prostatakarzinom überexprimiert. Der Grad des Tumors korreliert positiv mit dem COX2-Spiegel. Die Wirkung der NSAIDs könnte auf der Hemmung der COX-2 Enzyme beruhen [Madaan 2000].

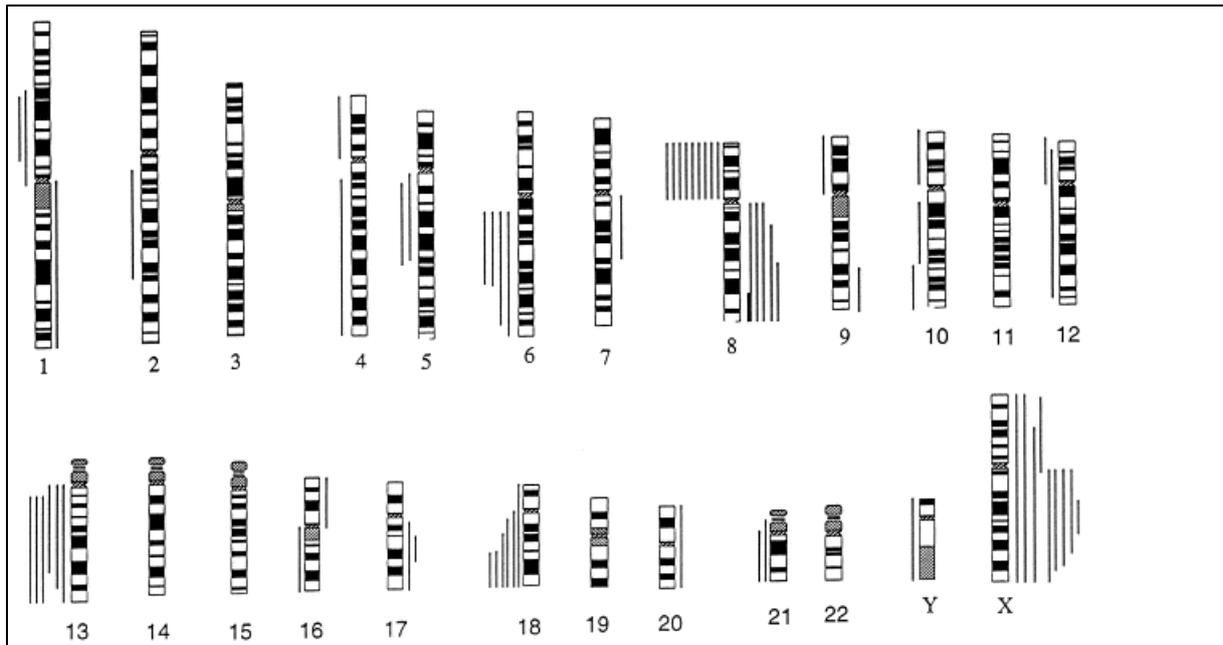
#### **1.1.5. Die Genetik des Prostatatumors**

Der mehrstufige Prozess der Tumorgenese, die Entstehung der malignen Tumore aus normalen Prostatazellen, ist mit einer Akkumulation von genetischen Defekten assoziiert. Betroffen sind klassische Onkogene und Tumorsuppressorgene (TSG) sowie weitere Gene, die mit kritischen Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Angiogenese, DNA-Reparatur und Arzneimittelresistenz assoziiert sind. Es kommt während der Progression von normalen Zellen zu hoch aggressivem metastasierendem und therapieresistentem Tumor und zur Deregulation und Dysfunktion dieser Gene. Schätzungsweise braucht es 5 bis 10 genetischer Alterationen für die Entwicklung einer normalen zu einer malignen Zelle. Bei manchen Tumorarten können derartige genetische Änderungen vererbt werden. Der Großteil der Veränderungen wird jedoch durch somatische Mutationen erworben [Fearon und Vogelstein 1990; Kallioniemi und Visakorpi 1996].

Beim Prostatakrebs handelt es sich um eine multifokale, heterogene Erkrankung die von genetischer Instabilität gekennzeichnet ist. So zeigen mehrere Untersuchungen, dass unterschiedliche Tumoreareale innerhalb einer Prostata, genotypisch heterogen sind [Macintosh 1998; Ruijter et al. 1999; Bostwick et al. 1998; Takimoto et al. 2001]. Die genetische Heterogenität wird bereits in der Vorläsion, der PIN festgestellt und deutet auf das Entstehen mehrerer, voneinander unabhängiger Tumoreläsionen innerhalb eines Organs hin [Bostwick et al. 1998; Visakorpi et al. 1995].

Untersuchungen mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH, Comparative Genomic Hybridization) haben die Deletionen in den Chromosomenbereichen 6q, 8p, 9p, 10q, 16q und 18q und Zugewinne in 7p, 7q, 8q und X als die am häufigsten betroffenen chromosomalen Regionen bei Prostatakrebs beschrieben [Kim et al. 2000; Fu et al. 2000; Alers et al. 2000; Nupponen et al. 1998; Visakorpi et al. 1995]. Abbildung 3 zeigt die Zusammenfassung der genetischen Veränderungen von 28 primären Prostatakarzinomen [FU et al. 2000].

Häufige Veränderungen in der PIN umfassen Verluste in 4q, 5q, 8p, 13q und Zugewinne von Chromosom 7, 8q, 12q, 15q und Xq. Diese Befunde deuten auf eine Akkumulation von Chromosomenänderungen während des PIN-Karzinom-Metastase-Verlaufs und auf die frühen genetischen Aberrationen in PIN Läsionen hin [Zitzelsberger et al. 2001].



**Abbildung 3:** Zusammenfassung aller Zugewinne und Verluste in 28 Prostatakarzinomen. Zugewinne sind als Linien auf der rechten und Verluste auf der linken Seite der Ideogramme gekennzeichnet. [Fu et al. 2000].

### 1.1.5.1. Chromosom 8

#### 1.1.5.1.1. Verlust des Chromosoms 8p

Deletionen am kurzen Arm des Chromosoms 8 wurden in den Epithelzellen des Prostata Tumors häufig festgestellt. Mehrere Untersuchungen mittels CGH, LOH (Loss of heterozygosity) und FISH (Fluoreszenz in Situ Hybridisation) zeigten, dass vor allem die Regionen 8p22, 8p21 und 8p12 betroffen sind [Macoska et al. 1994; Macoska et al. 1995]. Verluste von 8p22 wurden in 29 % bis zu 50 % der PIN Läsionen, 32 % bis zu 69% der primären Tumore und 65 % bis zu 100 % der metastasierenden Karzinome detektiert [MacGrogan et al. 1994; Bova et al. 1993].

Verlust von 8p12-21 wurde hingegen bei 63 % der PIN und 91 % der Tumorläsionen vorgefunden [Emmert-Buck et al. 1995]. Das Vorkommen von Deletionen am kurzen Arm des Chromosoms 8 im PIN Gewebe wird als Beweis für frühe Alterationen in der Tumorgenese von Prostatakrebs gesehen.

Das auf 8p22 lokalisierte Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-Gen (MSR1) wurde als ein Kandidat für den hereditären Prostatakrebs vorgeschlagen [Xu et al. 2002]. MSR1 codiert Untereinheiten eines homotrimeren Makrophagen-Scavenger-Rezeptors (MSR), der in der Lage ist, bakterielle Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäure sowie oxidierte Serumlipoproteine zu binden [Xu et al. 2002; Platt et al. 2001].

In einer Studie an Familien mit hohem Prostatakrebsrisiko wurde ein Zusammenhang zwischen einer seltenen Keimbahn-MSR1-Mutation (Pro 36 Ala, Ser 41 Tyr, Val113Ala, Asp174Tyr, Gly369Ser, His441Arg und Arg293X) und der Anfälligkeit an Prostatakrebs zu erkranken, festgestellt. In der Prostata ist die MSR1-Expression auf Makrophagen vor allem an Stellen mit Prostataentzündung beschränkt. Der Mechanismus, der den Zusammenhang zwischen dem Prostatakarzinom und den Defekten in der Funktion der Makrophagen definiert, ist noch unklar [Xu et al. 2002].

Das Lipoprotein-Lipase-Gen (LPL), das genauso auf 8p22 lokalisiert ist, spielt eine entscheidende Rolle im Fettstoffwechsel. LPL hydrolysiert Triglyceride sowohl in Chylomikrone als auch in Low-Density-Lipoproteine (LDL) und setzt Fettsäuren frei. Das Gen enthält 10 Exons und besitzt mehrere DNA-Varianten, die als Ser447stop-, HindIII- und Pvu II-Polymorphismen konzipiert sind [Merkel et al. 2002]. Rezente Studien in Japan beschreiben als häufige Modifikation den LPL Ser447 Stop-Polymorphismus insbesondere bei fortgeschrittenen Tumoren [Narita et al. 2004].

#### **1.1.5.1.2. Zugewinn an Chromosom 8q24**

Analysen mittels CGH an hormonrefraktären Prostatakarzinomen identifizieren den Zugewinn des gesamten langen Arms von Chromosom 8 als die häufigste genetische Aberration [Nupponen et al. 1998], der mit einem aggressiven Phänotyp assoziiert [Alers et al 2000]. Nahezu 90 % der hormonrefraktären Karzinome und Prostatatumore mit Fernmetastasen zeigen einen Zuwachs von 8q [Visakorpi et al. 1995; Alers et al. 2000; Cher et al. 1996].

Auf dem langen Arm des Chromosoms 8 wurden zwei unabhängige Subregionen festgehalten die häufig amplifiziert sind. Es ist daher naheliegend, dass zwei Zielgene die auf 8q21 und 8q23-24 lokalisiert sind, existieren [Nupponen et al. 1998; Cher et al. 1996].

Das Onkogen c-myc ist auf 8q24.1 lokalisiert [Dalla-favera et al. 1982], spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und malignen Transformation menschlicher Zellen und ist zahlreichen Tumorarten amplifiziert und überexprimiert [Dang 1999; Sakamuro und Prendergast 1999]. Beteiligt ist c-myc an wichtigen zellulären Funktionen inklusive Replikation, Wachstum, Metabolismus, Differenzierung und Apoptose.

Die Amplifikation von c-myc wurde bei primärem und fortgeschrittenem Prostatakrebs nachgewiesen [Jenkins et al. 1997; Bubendorf et al. 1999; Sato et al. 1999; Fukumoto et al. 1988]. Es wird vermutet, dass die Amplifikation bei Patienten mit lokalem und fortgeschrittenem Prostatakarzinom mit einer schlechten Prognose korreliert [Fukumoto et al. 1988]. Auch in PIN Läsionen wurden mittels FISH Analysen eine erhöhte Anzahl an c-myc Kopien festgestellt [Jenkins et al. 1997].

Andere mögliche Gene, die mit Prostatakrebs assoziiert sind, wären EIF3S3 (für eukaryotische Translationsinitiierung3, Untereinheit3), lokalisiert auf 8q23, und PSCA (Prostata-Stammzellantigen), lokalisiert auf 8q24.2 [Nupponen et al. 2000; Reiter et al. 1998].

Bei fortgeschrittenem Prostatakrebs wurde ein Verlust von 8p gleichzeitig mit dem Zugewinn des langen Arms von Chromosom 8 (8q) festgestellt. Diese Kombination von Ereignissen, die auf dem gleichen Chromosom auftreten - Verlust von 8p und Zugewinn von 8q - lässt die Bildung eines Isochromosoms i(8q) bei fortgeschrittenem Prostatakrebs vermuten [Macoska 2000].

#### **1.1.5.2. Chromosom X**

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein Mitglied der Steroid- und Schilddrüsenhormonrezeptor Superfamilie, kodiert das Androgenrezeptorprotein, welches die zelluläre Differenzierung und das intrazelluläre Wachstum der Prostata durch Androgene ermöglicht. Das AR-Gen ist auf dem Chromosom Xq11-13 lokalisiert und wurde mit der Progression und dem erhöhten Prostatakrebsrisiko in Verbindung gebracht [Gelman 2002].

Kurze CAG-Wiederholungen in Exon1 des AR-Gens, erhöhen, laut mehreren Studien, das Risiko an Prostatakrebs zu erkranken. Es wurde eine negative Korrelation zwischen den Längen der CAG-Wiederholung und dem Risiko beschrieben, wobei dieses Verhältnis nicht immer bestätigt werden konnte [Giovannucci et al. 1997; Bratt et al. 1999; Corea-Cerro et al. 1999]. Die Anzahl der CAG-Wiederholungen in der Keimbahn-DNA liegt zwischen 14 und 35 [Sartor et al. 1999]. Kürzere CAG-Wiederholungslängen sind mit einer höheren Transkriptions-Aktivität von AR assoziiert und somit mit dem höheren Risiko für die Entstehung oder Progression des Prostatakarzinoms verbunden [Camberlain et al. 1994].

Das AR-Gen wurde als Zielgen für die in hormonrefraktären Tumoren übliche Xq Amplifikation vorgeschlagen [Linja 2004]. CGH-Analysen zeigten einen Zugewinn des Chromosoms Xq in 17 % der PIN-Läsionen und in 25 % der Primärtumoren [Zitzelsberger et al. 2001; Fu et al. 2000]. Eine hohe Prävalenz von Zugewinnen des Chromosoms X wurde bei 40 % bis 73 % der primären Prostatakarzinome mittels FISH-Analysen festgestellt [Brown et al. 2002; Gburek et al. 1997].

Hochgradige Amplifikationen des AR-Gens wurden in 30 % der hormonrefraktären Karzinome beobachtet während unbehandelte Primärtumore keine solcher Aberrationen zeigten.

Bei Patienten mit Prostatakarzinom sind jedoch schon aufgrund einer Polysomie des Chromosoms X zusätzliche AR-Genkopien vorhanden [Ropke et al. 2004]. Vorhergehende Studien mittels Real-Time-PCR zeigten, dass eine zusätzliche Kopie des AR-Gens die Expression des Androgenrezeptors erhöhen kann. Demnach kann sogar ein geringer Anstieg der relativen Gendosis eine biologische Bedeutung haben [Linja et al. 2001].

Durch die Amplifikation des AR-Gens können die Zellen womöglich auch auf niedrige Ligandenkonzentrationen reagieren. Es wird vermutet, dass amplifizierte AR-Gene, abgesehen von Androgenen auch durch andere Liganden aktiviert werden können [Elo und Visakorpi 2001]. In menschlichen Prostatazelllinien wurde die Aktivierung von AR in Abwesenheit von Androgenen mit spezifischen Wachstumsfaktoren wie Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) und Epidermal Growth Factor (EGF) beobachtet [Culig et al. 1994].

Ein weiteres Gen auf Chromosom Xq27-28, das Hereditary Prostate Cancer X wurde durch Untersuchungen an 360 Familien, beschrieben. Analysen mittels 26 Markern auf dieser Region zeigten eine signifikante Verbindung mit Prostatischem Adenokarzinomen [Xu et al. 1998].

Auf Chromosom X ist ein weiteres Gen, das PAGE-4 lokalisiert und wird bei Prostatakrebs überexprimiert. Interessanterweise zeigt eine Zelllinie, die PAGE4 exprimiert, eine Abnahme in der LPL Expression [Iavarone et al. 2002].

## **1.2. Atrophie der Prostata**

### **1.2.1. Definition**

Die Atrophie der Prostata wird als die Reduktion des Volumens bereits vorhandener Drüsen und Stroma beschrieben und kann in zwei Formen unterteilt werden, diffus und fokal [McNeal 1988]. Die diffuse Atrophie resultiert aus einer Abnahme der zirkulierenden Androgene und betrifft relativ gleichmäßig, die gesamte Prostata [Mc Neal 1968]. Die Androgen Abnahme wird am häufigsten durch die Orchiectomie, die Antiandrogene oder durch Hormon-Agonisten die das luteinisierende Hormon freisetzen, erzielt. Die diffuse Atrophie weist eine ausgeprägte Zellschicht mit hohen säulenförmigen Luminalzellen, vermindertem Zellvolumen und vakuolisiertem Zytoplasma auf [Murphy et al. 1991; Reuter 1997].

Im Gegensatz dazu steht die fokale Atrophie nicht mit den geringeren zirkulierenden Androgenen in Zusammenhang. Sie tritt als Läsionen von atrophischem Epithel, umgeben von normalen Epithelzellen auf. Die nicht-prominente Basalzellschicht ist oft abgeschwächt, wobei in einigen Fällen die Azini innerhalb der fokalen Atrophie völlig frei von Basalzellen sein können [Parsons et al. 2001].

Fokale Atrophie ist in der Prostata älterer Männer häufig vorzufinden. So wurde in 85 % der untersuchten Autopsien, die von über vierzigjährigen Männern stammten, Läsionen mit fokaler Atrophie festgestellt. Prostataatrophie gilt als häufigste Mimik des Adenokarzinoms und treten als multifokale Läsionen vorwiegend in der peripheren Zone zusammen mit Prostatakrebs und PIN auf [Billis 1998].

### **1.2.2. Klassifikation**

Die verschiedenen morphologischen Varianten der fokalen Atrophie wurden zuerst von Franks klassifiziert [Franks 1954]. Fünf verschiedene Muster wurden wie folgt beschrieben: einfache Atrophie mit Zystenbildung, einfache Atrophie ohne Zystenbildung, sklerotische Atrophie, lobuläre Hyperplasie und sklerotische Atrophie mit Hyperplasie.

Die Klassifikation von Franks wurde überholt und wird nicht mehr einheitlich verwendet. Eine standardisierte Terminologie wurde entwickelt und eingeführt [DeMarzo et al. 2006].

Die Atrophie der Prostata wird in 4 Subtypen unterteilt (siehe Abbildung 4):

- I) Einfache Atrophie
- II) Einfache Atrophie mit Zystenbildung
- III) Partielle Atrophie
- IV) Postatrophische Hyperplasie

## **I) Einfache Atrophie**

Bei geringer Vergrößerung scheinen die meisten Läsionen basophil, was den relativen Mangel an Cytoplasma sowohl apikal als auch lateral im Vergleich zu normalem Epithel widerspiegelt. Trotz einer gewissen Variabilität, erscheinen die Azini in ihrer normalen Größe. In manchen Fällen jedoch fehlen Azini und Duktus in atrophischen Regionen. Die Zahl der Azini pro Einheit ist, verglichen mit normalem Epithelium, nicht erhöht. Einige Azini in der einfachen Atrophie können ziemlich vergrößert sein, werden im gegenwärtigen Klassifikationssystem jedoch nicht als "einfache Atrophie mit Zystenbildung" bezeichnet. Sie sind unregelmäßig geformt und können gewinkelt sein. Die meisten dieser Läsionen enthalten chronische Entzündungszellen im Stroma, im Epithel oder im Lumen. Auch akute inflammatorische Zellen können auftreten.

## **II) Einfache Atrophie mit Zystenbildung**

Dieser Subtyp umfasst zwei allgemeine Muster: Runde Azini mit sehr großem Durchmesser (> 1 mm) und abgerundete kleinere Azini. Bei einfacher Atrophie mit Zystenbildung sind die Azini nicht einfach vergrößert, sondern sind abgerundet und erscheinen zystenartig. Die Meisten zeigen eine Rücken-an-Rücken-Konfiguration mit wenig dazwischenliegendem Stroma. Die Menge an Cytoplasma kann so abgeschwächt sein, dass sie selbst bei hoher Leistung nahezu unsichtbar erscheint. In den Läsionen der einfachen Atrophie mit Zystenbildung sind keine oder nur vereinzelt Entzündungszellen vorhanden.

## **III) Partielle Atrophie**

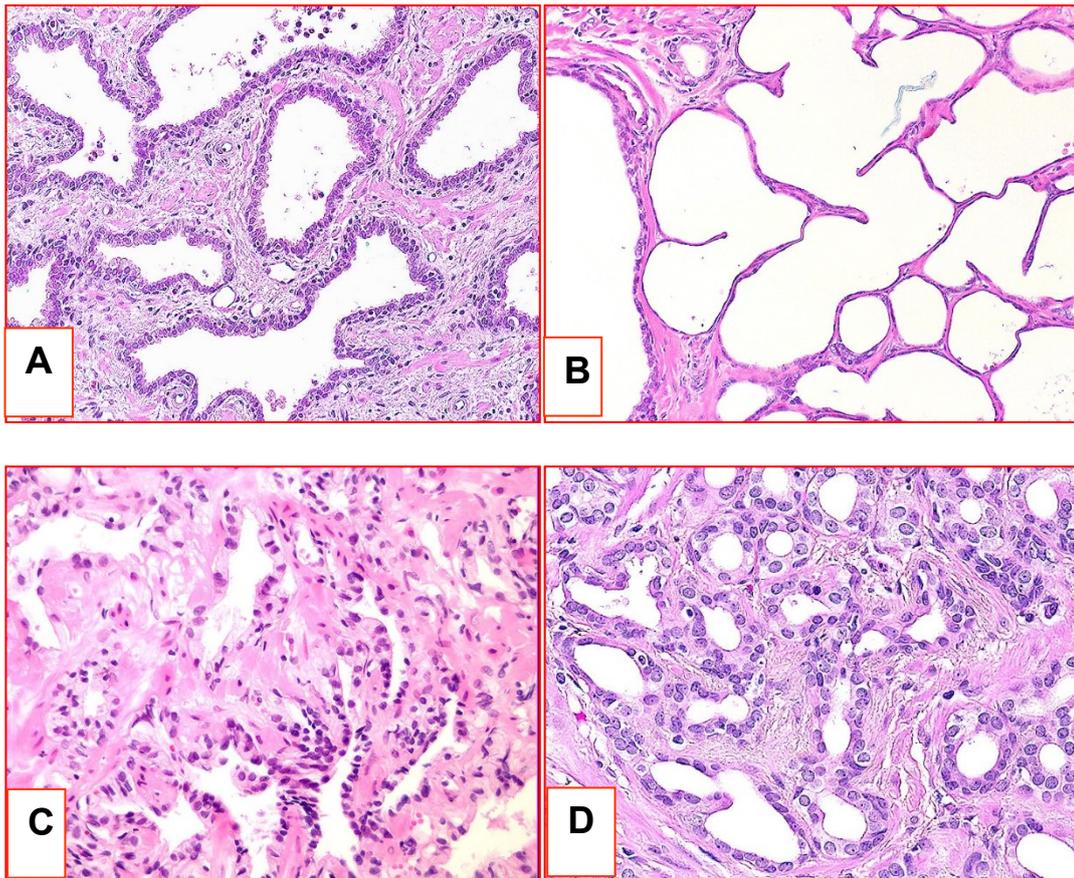
Die meisten Luminalzellen in der partiellen Atrophie enthalten, verglichen mit normalen Zellen, weniger Zytoplasma, dennoch mehr als die anderen Subtypen der Atrophie. Das Zytoplasma erscheint in den meisten Zellen klar und es ist mehr Zytoplasma lateral vom Nukleus vorhanden. Unter niedriger Vergrößerung erscheint die partielle Atrophie nicht basophil. Die moderate Vergrößerung der Nuclei führt in manchen Fällen zur diagnostischen Verwechslung mit dem Adenokarzinom der Prostata.

## **IV) Postatrophische Hyperplasie**

Postatrophische Hyperplasie (PAH) erscheint unter niedriger Vergrößerung oft basophil. Es besteht aus Azini, die klein, meist rund und in lobulärer Verteilung angeordnet sind.

Die meisten dieser Läsionen enthalten niedrige kubische Zellen mit sehr wenig Cytoplasma, sowohl lateral als auch apikal zum Kern der atrophischen Zellen. Die Läsionen erscheinen

wegen der kompakt angeordneten Azini hyperplastisch. Es wird angenommen, dass die Anzahl der Azini verglichen mit Normalgewebe, erhöht ist. Wie bei partieller Atrophie kann die wenig bis moderate Vergrößerung der Nuclei (bis hin zu 1.5 mm) zur Verwechslungen mit dem Adenokarzinom und zu falschen Diagnosen führen. Akute Entzündungszellen können auftreten. Chronische Entzündungszellen kommen, wie in der einfachen Atrophie, im Stroma, Epithelium oder Lumen vor.



**Abbildung 4:** Verschiedene Subtypen der fokalen Atrophie demonstriert an H&E Schnitten: A) einfache Atrophie; B) Einfache Atrophie mit Zystenbildung C) partielle Atrophie; D) Postatrophische Hyperplasie [De Marzo et al. 1999].

### 1.2.3. Epidemiologie

Der Alterungsprozess zählt zu den wichtigsten Risikofaktoren der Prostata-Atrophie. In einer Autopsie-Studie waren fast die Hälfte der Prostataatrophierten (44,70 %) im Alter von über 65 Jahren und nur 16.47 % zwischen 40 und 54 Jahren alt [Billis 1998].

Andere Faktoren, die bei der Pathogenese der Prostataatrophie eine Rolle spielen können, umfassen Kompressionen, die durch hyperplastische Knoten, Entzündungen, Hormone, Nährstoffmangel und durch Ischämie zustande kommen [Billis 1998; Franks 1954; Moore 1936; Liavag 1968].

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor, der mit Prostataatrophie verbunden ist, ist die chronische Entzündung. In mehreren Untersuchungen wurden Entzündungsinfiltrate in 32 bis 88 % der atrophischen Läsionen gefunden [Anton et al. 1999; Shah et al. 2001; Ruska et al. 1998]. Eine Studie an Gewebeproben von Prostatapatienten zeigte, dass BK-Virussequenzen in gutartigen und prostatistischen Läsionen auftreten. Dieser Vertreter von Papovaviren kann durch die Funktion seines großen Tumorigens (Tag), eine Tumorgenese bei Menschen induzieren. Die Expression von Tag wurde nur bei atrophischen Läsionen beobachtet [Das et al. 2004].

Eine chronische Ischämie, die durch eine lokal intensive Arteriosklerose verursacht wird, scheint ein potentieller Risikofaktor für eine Prostataatrophie zu sein. Eine intensive Arteriosklerose (> 75 % Reduktion des Gefäßlumendurchmessers) wurde bei 52.94 % der Patienten mit Prostatahyperplasie und bei nur 13.33 % der Patienten ohne Atrophie festgestellt [Billis 1998].

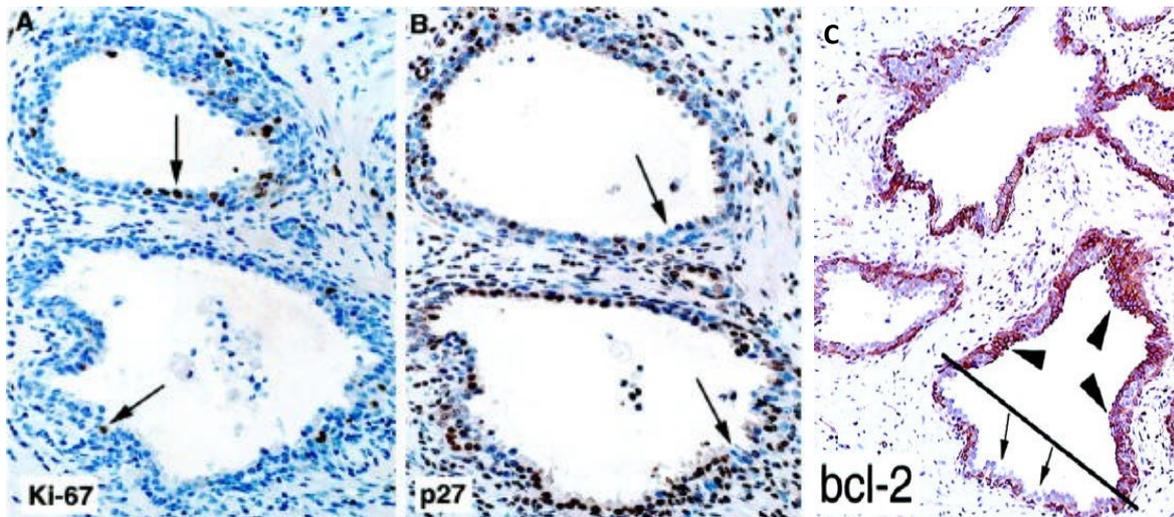
Eine Studie mit Farb-Doppler zeigte in Arealen der Prostata-Atrophie eine fehlende Strömung in 60 %, eine vorhandene Strömung in 30 % und eine Zunahme der Strömung in 10 % der atrophischen Läsionen. Ein fehlender Fluss kann ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Rolle einer lokalen Ischämie in der Pathogenese der Prostataatrophie sein [Meirelles 2002].

#### **1.2.4. Immunhistochemische Untersuchungen**

Durch immunhistochemische Analysen wurden überraschende Merkmale der Prostata-Atrophie identifiziert. So wurde durch den Proliferationsmarker Ki-67 gezeigt, dass die Atrophie der Prostata, einschließlich der PAH keine Involution durchläuft, sondern proliferativ ist [Ruska et al. 1998].

Eine weitere Studie untersuchte die Anzahl der Kerne, die positiv für MIB-1 sind. Die Ergebnisse des proliferativen Index zeigen folgenden Gradienten: benigne Prostata (1.20 %), einfache Atrophie (2.67 %), PAH (3.62 %), HGPIN (6,14 %) und Prostatakrebs (12 %). Ein signifikanter Unterschied in der Proliferation wurde zwischen den verschiedenen Typen der Atrophie gefunden. Die einfache Atrophie wies einen Proliferationsindex auf, der größer war als die benigne Prostata, aber signifikant geringer als die PAH [Shah et al. 2001].

Eine erhöhte Expression von bcl-2, die mit einer niedrigeren Apoptose einhergeht, wurde in atrophischen Arealen der Prostata berichtet. Der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p27<sup>Kip1</sup> gilt als Suppressor der Proliferation der Epithelzellen. Eine Downregulierung von p27<sup>Kip1</sup> wurde in der Atrophie der Prostata festgestellt [De Marzo et al 1999]. Die Abbildung zeigt Bilder der immunhistochemischen Untersuchungen mit den Markern Ki-67, p27 und bcl-2 in atrophischen Läsionen der Prostata.



**Abbildung 5:** Expression der Marker für Proliferation, Differentiation und Apoptose: A) Erhöhte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in sekretorischen Zellen B) Geringe Expression des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p27 in sekretorischen Zellen C) Erhöhte Expression von bcl-2 [De Marzo et al. 1999].

Ein weiterer Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor, p16 ist in atrophischen Drüsen, verglichen mit normalem Epithel, erhöht [Faith et al. 2002]. Bei primären Prostatakarzinomen wird das p16 in über 80 % der Fälle überexprimiert [Lee et al. 1999; Jarrard et al. 2002]. Diese Veränderung wird auch beim Vorläufer des Prostatakarzinoms dem HGPIN beobachtet [Henshall et al. 2001].

Im normalen, nicht-atrophischen Prostataepithel wird GSTP1, ein induzierbares Enzym, das die Zellen vor DNA-Schäden schützt, vorwiegend in Basalzellen exprimiert. Die Expression fehlt bei humanem Prostatakarzinom aufgrund von Inaktivierung durch Promotor-Hypermethylierung, ähnlich wie bei hochgradigem PIN, wobei hier in mindestens 70% der Fälle eine Promotor-Hypermethylierung vorliegt [Lee et al. 1994; Lee et al. 1997; Brooks et al. 1998].

Viele der sekretorischen Zellen in der Prostataatrophie exprimieren erhöhte Spiegel von GSTP1, was auf eine stressinduzierte Reaktion in diesen Zellen hindeutet. Es wird angenommen, dass viele der Atrophie-Zellen vor oxidativem Stress und vor elektrophiler Schädigung geschützt sind. Doch dürften einige proliferative sekretorische Zellen, denen die kein GSTP1 exprimieren (Abbildung 6) von genetischen Veränderungen und neoplastischen Transformationen betroffen sein [De Marzo et al. 1999].



**Abbildung 6:** Heterogenität der GSTP1-Expression in der “Proliferative Inflammatory Atrophy, PIA” [De Marzo et al. 1999].

GSTA1, ein weiteres Enzym katalysiert die Entgiftung von reaktiven Elektrophilen und Oxidantien und schützt vor neoplastischer Transformation [Hayes und Pulford 1995]. GSTA1 fehlt im normalen Epithel der Prostata im Gegensatz zu GSTP1, welches im Großteil der normalen Basalzellen exprimiert wird. Ein signifikanter Anstieg der Expression von GSTA1 wurde in proliferativen PAH Läsionen die mit chronischer und akuter Entzündungen assoziiert sind verglichen zu dem in normalen peripheren Zonen vorgefunden [Parsons et al. 2001].

Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist die induzierbare Isoform der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme, die Arachidonsäure in pro-inflammatorische Prostaglandine umwandelt, sowie ein primäres Ziel für nicht-steroidale Antirheumatika darstellt. Zunehmende Beweise deuten darauf hin, dass die Hochregulation von COX-2 mit der Karzinogenese mehrerer Organsysteme wie Dickdarm, Lunge, Brust und Prostata assoziiert ist [Wolff et al. 1998; Hwang et al. 1998; Shirahama 2000; Gupta et al. 2000; Kirschbaum et al. 2000]. Grundsätzlich ist in den meisten Fällen der Prostatakarzinome eine Überexpression von COX-2 festzustellen

während die Expression im normalen Gewebe fehlt. [Gupta et al. 2000; Kirschenbaum et al. 2000; Kirschenbaum et al. 2000; Madaan et al. 2000; Tanji et al. 2000; Yoshimora et al. 2000]. Interessanterweise wurde durch eine Studie eine intensive COX-2 Färbung in der Prostata-Atrophie festgestellt, wobei die Markierung im Prostatakarzinom nicht beobachtet wurde. [Zha et al. 2001].

### **1.2.3. Genetische Veränderungen in atrophischen Läsionen**

In der menschlichen Prostata kann die überwiegende Mehrheit der hochgradigen PIN- und Prostata-Adenokarzinom-Läsionen GSTP1 nicht exprimieren, dessen Verlust mit einer Hypermethylierung der CpG-Insel verbunden ist, die den GSTP1-Promotor umfasst. Methylierungen an dieser Stelle wurden in bis zu 100% der Prostatakrebs-DNA-Proben und in etwa 70% der hochgradigen PIN-Zellen nachgewiesen. Grundsätzlich ist eine Hypermethylierung des GSTP1-Promotors in normalem Prostatagewebe nicht vorzufinden. [Lee et al. 194; Lin et al. 2001; Jeronimo et al. 2001; Millar et al. 1999; Chu et al. 2002; Goessl et al. 2002; Brooks et al. 1998].

Eine kleine Untergruppe von PIA-Läsionen (6,3%) in der menschlichen Prostata enthält eine nachweisbare Hypermethylierung dieser Region. Im Gegensatz dazu enthält keine der Zellen im normal erscheinenden Epithel diese molekulare Veränderung [Nakayama et al. 2003].

In einer Studie mit PAH wurden p53-Mutationen in 5,3 % der Atrophie-Läsionen, 4,2 % der hochgradigen PIN und 25 % der Adenokarzinome nachgewiesen [Tsujiimoto et al. 2002].

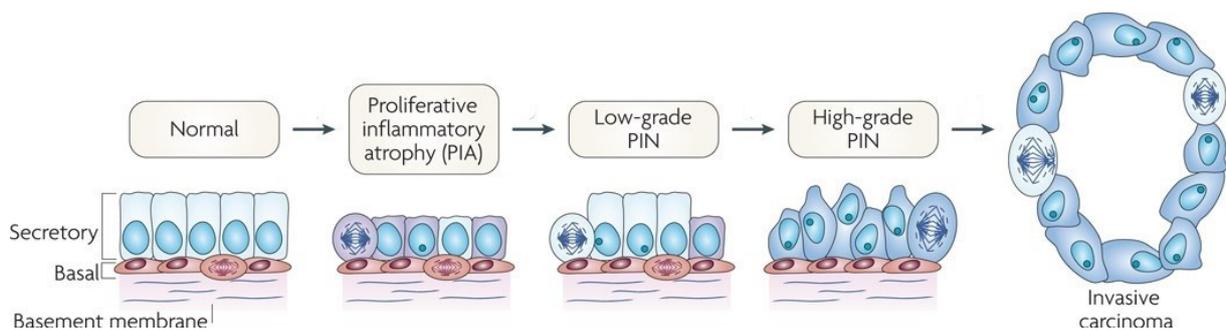
Untersuchungen mittels Interphase-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung haben den Verlust von Chromosom 8p22 und 8 Zentromer (8c) in einer kleinen Anzahl (n = 7) atrophischer Läsionen identifiziert. Eine Zunahme der Anzahl der Kerne mit Trisomie 8 in den atrophischen Läsionen wurde mit derselben Methode untersucht. Der Zugewinn von Chromosom-8-Zentromersequenzen wurde bei 1,3 % der normalen, 2,1 % der einfachen Atrophie, 2,8 % der hochgradigen PIN, 4,0 % der postatrophischen Hyperplasie und 6,0 % der Adenokarzinome beobachtet [Shah et al. 2001]. Eine weitere FISH-Analyse konnte die Ergebnisse jedoch nicht verifizieren. Es konnten weder ein Zugewinn noch ein Verlust am Chromosom 8 ausfindig gemacht werden. Dies wurde mit dem strengeren statistischen Cut-off-Level für genetische Veränderungen in dieser Studie erklärt [Bethel et al. 2006].

Kürzere CAG-Wiederholungen sind mit einer höheren Transkriptionsaktivität verbunden. Eine In-situ-Verkürzung der CAG-Wiederholungen im Karzinom, in der HGPIN und in der PAH wurde in 8,8 %, 17,6 % bzw. 30 % der Läsionen gefunden. Die Frequenz der CAG-Verkürzung war bei PAH signifikant höher als bei PCA-Läsionen. Die Länge der GGC-Wiederholungen, BAT-25 und BAT-26 (Marker für die Detektion der Mikrosatelliteninstabilität) war bei allen

Läsionen identisch, was auf die Abwesenheit von Mikrosatelliteninstabilität im Prostatakarzinom hinweist [Tsujiimoto et al. 2004].

### 1.3. Das Mehrstufen- Progressions- Model

Die frühen Ideen von Franks [1954] und Laivag [1968], dass Atrophie und postatrophische Hyperplasie an der Pathogenese von Prostatakrebs beteiligt sind, wurden lange Zeit ignoriert. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch eine erhöhte Proliferationsaktivität und verminderte Apoptose in einigen atrophischen Bereichen der Prostata, was das Konzept einer regenerativen Läsion nahelegt. Der Begriff "Proliferative inflammatorische Atrophie (PIA)" wurde vorgeschlagen, um die Tatsache zu betonen, dass diese Läsionen (einfache Atrophie und PAH) proliferativ sind und mit einer Entzündung einhergehen [De Marzo et al 1999]. Mehrere Beweise weisen darauf hin, dass PIA eine Vorläuferläsion des Prostatakarzinoms oder von der PIN ist. Ein mehrstufiges Progressionsmodell beschreibt die Entwicklung von normalem Epithel zu fokaler Prostata-Atrophie zu PIN und dann zum Karzinom. Nach diesem Modell führen anhaltende Verletzungen des normalen Prostataepithels zu Zellschädigung und Zelltod. Es erfolgt eine Zellregeneration und dies manifestiert sich in der Prostataatrophie. Diese Prostatazellen sprechen auf erhöhten oxidativen Stress an und werden einer Gewebereparatur bzw. einer Gewebeerneuerung unterzogen. Diese Zellen können somatischen genetischen Veränderungen unterliegen, die zu einer neoplastischen Transformation führen [De Marzo et al. 1999, Nelson et al. 2003, De Marzo et al. 2007].



**Abbildung 7:** Model der Prostata Neoplasie Progression [De Marzo et al. 2007].

#### **1.4. Fragestellung**

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genetische Instabilität der Epithelzellen in der Prostataatrophie zu untersuchen. So wurden in erster Linie genetische Veränderungen an Chromosom 8, die im Prostatakarzinom häufig auftreten, wie Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24 analysiert. Um feststellen zu können, ob die genetischen Veränderungen in der Atrophie charakteristisch sind, wurden die Daten, mit den genetischen Analysen die unter denselben Bedingungen im Normalgewebe, in der PIN und im Karzinom durchgeführt wurden, verglichen.

Weiters wurde der Frage nachgegangen, ob in den Atrophie-Läsionen weitere chromosomale Veränderungen vorzufinden sind und ob diese auch im gepaarten Karzinom auftreten.

Die genetische Instabilität wurde als das Vorkommen von numerischen chromosomalen Alterationen, die verglichen mit der Kontrollgruppe, einen signifikant höheren Anteil an genetisch veränderten Kernen vorweisen, definiert.

## **2. Material und Methoden**

Um die genetische Instabilität der Prostataatrophie zu untersuchen und mit den genetischen Veränderungen im Normalgewebe, in der PIN und im Prostatakarzinom zu vergleichen, wurden zwei verschiedene genetische Analysemethoden angewendet. Mittels der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (engl. Fluorescence in Situ Hybridization; FISH) wurden genetische Veränderungen am Chromosom 8 untersucht und mit der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (engl. Comparative Genomic Hybridisierung; CGH) wurden Deletionen, Amplifikationen und numerische Veränderungen am gesamten Genom durchsucht. Die Ergebnisse der CGH-Analyse wurden anschließend mittels FISH-Untersuchungen verifiziert [Yildiz-Sezer et al. 2006; Yildiz-Sezer et al. 2007].

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Gewebeproben für die FISH Analyse**

In Paraffin eingebettetes Prostatagewebe wurde für die FISH-Untersuchungen herangezogen. Das Material stammte aus dem Archiv des Instituts für anatomische Pathologie und wurde im Zeitraum von 1999 bis 2005 mittels radikaler Prostatektomie in der urologischen Klinik der Universität Innsbruck entnommen. Analysiert wurden Proben von 50 Patienten, die davor eine schriftliche Einwilligung zur Verwaltung klinischer und pathologischer Daten in anonymer Form für wissenschaftliche Publikationen erteilt hatten [Yildiz-Sezer et al. 2006].

Das Mittlere Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Diagnose 61,1 Jahre (Spw: 43 bis 79 Jahre). Bei 36 Patienten wurde ein Tumorstadium von pT2 und bei 14 Männern ein Tumorstadium von pT3 festgehalten [Yildiz-Sezer et al. 2006].

Bei 24 Patienten wurde ein Gleason-Score 7, bei 17 Patienten ein Gleason-Score von 6, bei 7 Patienten ein Gleason Score von 8 und bei 2 Patienten ein Gleason Score von 9 diagnostiziert [Yildiz-Sezer et al. 2006].

Die Kontrollgruppe bestand aus 10 Prostatektomieproben, die von Männern entnommen wurden, die an anderen Ursachen verstorben waren. Das mittlere Alter der Männer aus der Kontrollgruppe betrug 59,8 Jahre (Spw.: 18 bis 76 Jahre). Die Prostataprobe der Kontrollgruppe enthielten in keinem Fall Areale mit Adenokarzinomen [Yildiz-Sezer et al. 2006].

### 2.1.2. Gewebeproben für die CGH-Analyse

Für die CGH-Analysen wurden Prostatektomiepräparate aus dem Archiv des Instituts für anatomische Pathologie, die im Zeitraum von 1999 bis 2005 an der urologischen Klinik der Universität Innsbruck entfernt wurden, herangezogen. Untersucht wurden die Prostataatrophien von 20 Patienten. Mittels anschließender FISH-Analysen in den entsprechenden Atrophie-Läsionen wurden die CGH-Daten verglichen und gesichert. Auch die Tumoraläsionen derselben Patienten wurden mittels FISH Analysen untersucht und mit den Daten der FISH Untersuchungen der atrophien Gewebeareale verglichen.

Das mittlere Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Diagnose 59,8 Jahre (Spw.: 43 bis 73 Jahre). Bei 14 Patienten wurde ein Tumorstadium von pT2 und bei 6 Männern ein Tumorstadium von pT3 festgehalten [Yildiz-Sezer et al. 2006].

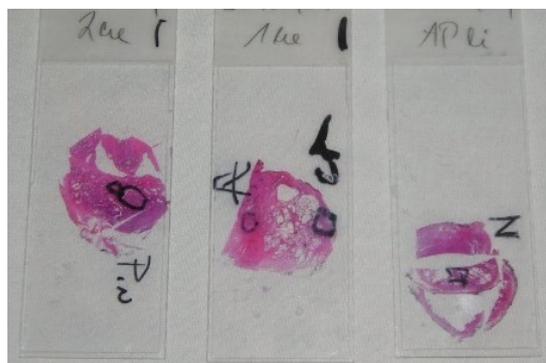
Bei einem Patienten wurde ein Gleason-Score 5, bei 6 Patienten ein Gleason-Score von 6, bei 9 Patienten ein Gleason-Score von 7, bei 3 Patienten ein Gleason-Score von 8 und bei einem Patienten ein Gleason-Score von 9 diagnostiziert [Yildiz-Sezer et al. 2006].

Als Kontrollgruppe dienten die 10 Proben, die zuvor für die FISH-Analysen verwendet wurden und von verstorbenen, tumorfreien Patienten stammten [Yildiz-Sezer et al. 2006].

## 2.2. Methoden

### 2.2.1 Diagnose der Gewebeläsionen

Die entsprechenden Geweberegionen der Prostatektomien wurden an Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitten ermittelt. Uropathologen untersuchten die Objektträger und markierten die Areale mit Normalgewebe, Atrophie, PIN und Karzinom (Abbildung 8). Um die Entnahme der Gewebeproben aus den Paraffinpräparaten zu erleichtern, wurden nur atrophische Läsionen, die mindestens 5 mm vom Krebsgewebe entfernt sind, gekennzeichnet [Yildiz-Sezer et al. 2006].



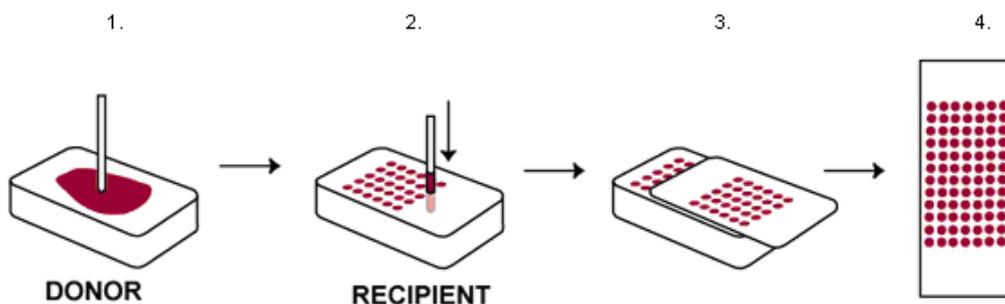
**Abbildung 8:** H&E gefärbte Gewebeschnitte eines Patienten mit markierten Läsionen

### 2.2.2. Tissue Micro Array

Die Tissue Micro Arrays (TMA) beinhalten mehrere Gewebestanden in einem Paraffinblock und ermöglichen somit die Analyse gleichzeitig von mehreren Proben unter denselben Bedingungen [Kononen et al. 1998]. Somit konnten unterschiedliche Gewebeläsionen mit exakt denselben Vorbehandlungsschritten und Konditionen für die FISH-Untersuchungen präpariert werden.

Für die Erstellung der TMAs wurde das Beechers Tissue Microarray Instrument herangezogen. Entsprechend den von den Uropathologen gekennzeichneten Läsionen wurden die Areale an den Paraffinblöcken der Prostatektomieproben markiert. Durch die angebrachten Nadeln am Beechers Instrument wurden Gewebezyylinder im Durchmesser von 2 mm entnommen und in einen leeren Paraffinblock eingestanzt [Yildiz-Sezer et al. 2006]. Die Erstellung der TMAs ist in der Abbildung 9 schematisch dargestellt. Um zu gewährleisten, dass sich das Gewebe im Paraffin vollständig einbettet, wurden die TMA-Blöcke bei 50°C für mindestens 12 h im Brutschrank gelagert. Mittels eines Mikrotoms wurden anschließend 4 µm Schnitte entnommen und auf Objektträgern angebracht. Die Objektträger wurden wiederum im Brutschrank bei 50°C für 3 Tage gelagert [Yildiz-Sezer et al. 2006].

Die Gewebezyylinder wurden nicht nach Patienten und Art der Läsionen geordnet eingestanzt, sondern zufällig in den Empfängerdonor eingebracht. Dadurch wurde verhindert, dass während der FISH-Untersuchungen von vornherein bekannt war um welchen Gewebetyp es sich handelte. Erst während der Statistik wurden die Zylinder wieder entschlüsselt und die Ergebnisse den Gewebetypen zugeordnet [Yildiz-Sezer et al. 2006].



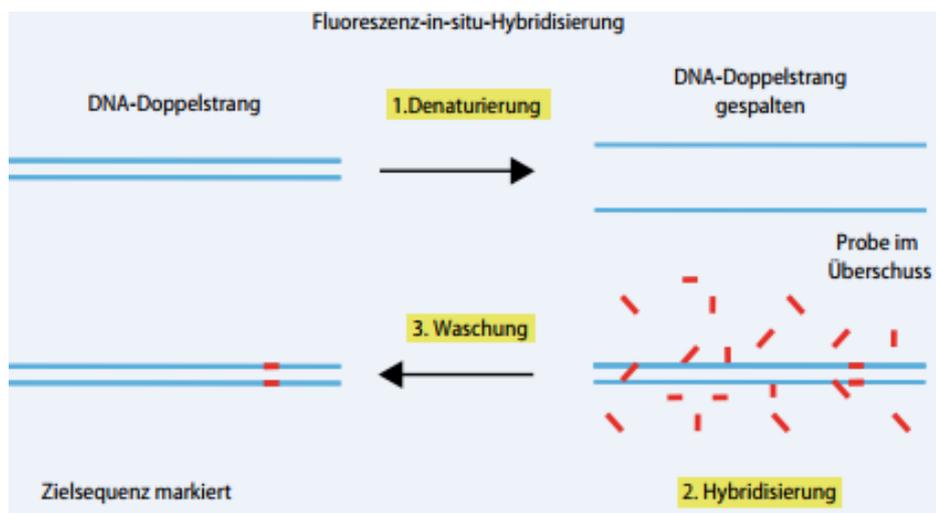
**Abbildung 9:** Erstellung der Tissue Microarray von Normalgewebe, Atrophie der Prostata, PIN und Karzinom nach [Kononen et al. 1998].

1. Gewebezyylinder wird vom Paraffinblock entnommen
2. In einen neuen Paraffinblock eingestanzt
3. Am Mikrotom wird ein histologischer Schnitt entnommen
4. TMA-Schnitt wird auf einen Objektträger transferiert.

### 2.2.3. Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung erlaubt die Darstellung spezifischer DNA-Sequenzen in einzelnen Interphase-Zellen und somit die Quantifizierung von Chromosomen und Genen in Gewebeproben. Mittels spezieller Sonden werden chromosomale Regionen markiert und mittels Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht.

Die FISH-Methode beruht auf der gleichzeitigen Denaturierung und Hybridisierung der DNA-Sonde und der Ziel-DNA (Abbildung 10). Durch die Denaturierung öffnet sich der DNA-Doppelstrang, worauf sich die markierte DNA-Sequenz der FISH-Probe an die komplementäre Stelle am Chromosom anlagern kann. Überschüssige Proben werden nach der Hybridisierung in einem Waschschrift entfernt. Kommerzielle FISH-Proben sind direkt mit Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass kein zusätzlicher Detektionsschritt erforderlich ist [Savic und Bubendorf 2007; Chen und Chen 2013].



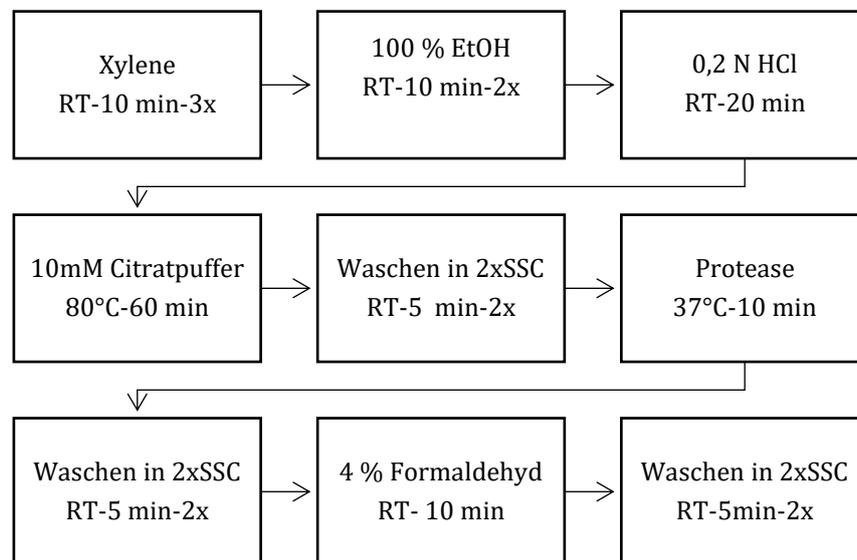
**Abbildung 10:** Ablaufschema der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung [Savic und Bubendorf 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurden die FISH -Analysen unter Verwendung einer handelsüblichen, mehrfarbigen Sonde (ProVision, Abbott / Vysis, Des Plaines, IL, USA) durchgeführt [Yildiz-Sezer et al. 2006].

### 2.2.3.1. Vorbehandlung

Die Markierung der Gene mittels der FISH Sonde erfolgte nach entsprechender Vorbehandlung der TMA-Schnitte. Das in Paraffin eingebettete Material wurde nach der Prostatektomie mit Formalin fixiert. Dies führt dazu, dass sich Methylen-Brücken zwischen den Aminogruppen der DNA und den Proteinen bilden. Dies verhindert, dass sich die Antikörper in die DNA-Abschnitte durchdringen und binden können. Eine Vorbehandlung mit NaSCN, die bei FISH-Analysen gängig ist, führt bei TMA-Proben jedoch dazu, dass mehrere Gewebestanden sich vom Objektträger ablösen und verlorengehen. Eine Präparation mit Citratpuffer hat dieselbe erwünschte Wirkung und verhindert zudem den Verlust des Gewebematerials [Chin et al. 2003].

Die Objektträger wurden zu Beginn in einer Xylol-Reihe (3x) und Ethanol-Reihe (2x) entparaffiniert. Die Permeabilisierung erfolgte bei Raumtemperatur durch eine Inkubation der Objektträger in 0,2N HCL, dH<sub>2</sub>O und SSC-Lösung (Sodium-Saline-Citrat Lösung). Die Behandlung mit Citratpuffer erfolgte für 60 Minuten bei 80°C und wurde mit der SSC-Reihe beendet. Die Andauung erfolgte mittels einer Protease-Lösung bei 37°C. Gewaschen wurden die Objektträger erneut in einer SSC-Lösung bei Raumtemperatur. Für die Nachfixierung der Präparate wurde eine 4 % Formaldehydlösung verwendet, gefolgt einer Waschung mit in einer SSC-Reihe [Yildiz-Sezer et al. 2006]. Die Vorbehandlung ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.



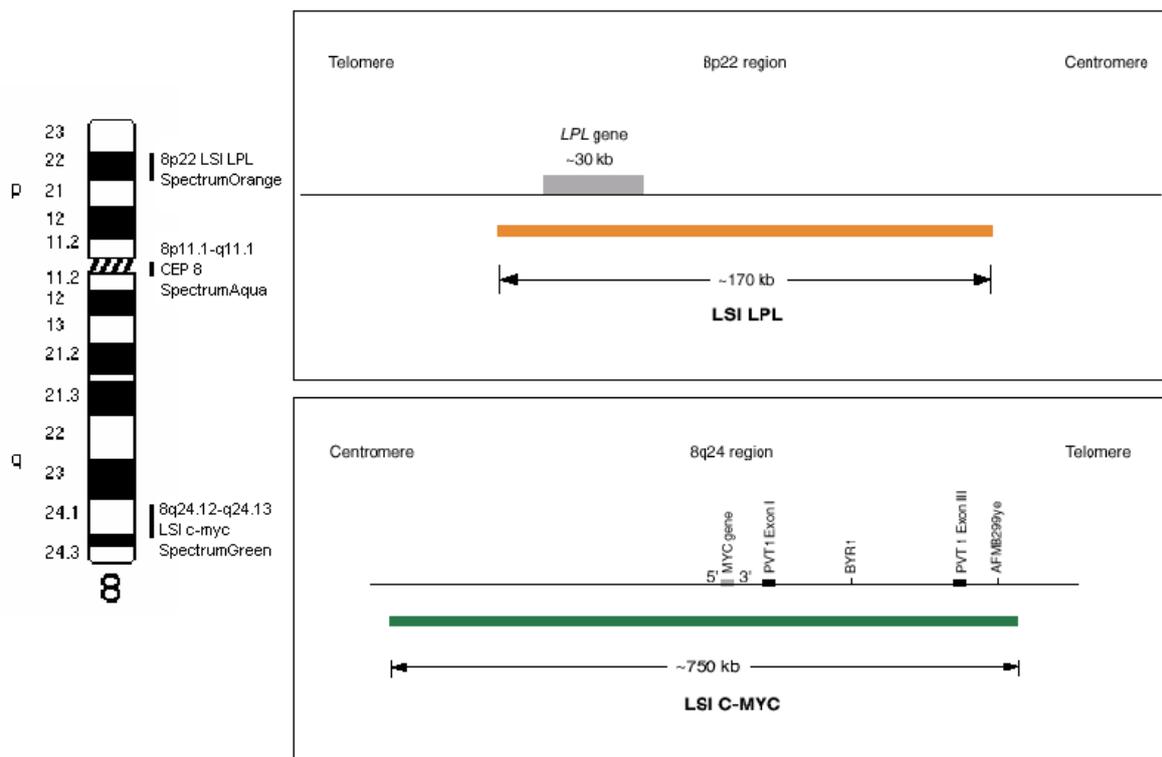
**Abbildung 11:** Modifiziertes Vorbehandlungsschema nach [Chin et al. 2003].

### 2.2.3.2. Denaturierung und Hybridisierung

Die Proben wurden in Ethanol, entlang eines Konzentrationsgradienten (70 %, 85 %, 100 % EtOH) dehydriert. Die DNA-Sonde (5 µl) wurde auf die Objektträger aufgetragen und gemeinsam mit den Gewebeproben bei 80°C für 5 Minuten denaturiert und 24 Stunden bei 37°C hybridisiert. Das Postwashing erfolgte in einer SSC Reihe bei 37°C und 72°C. Anschließend wurden die Objektträger mit 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol in Antifade-Lösung (DAPI) gegengefärbt [Yildiz-Sezer et al. 2006].

### 2.2.3.3. Detektion

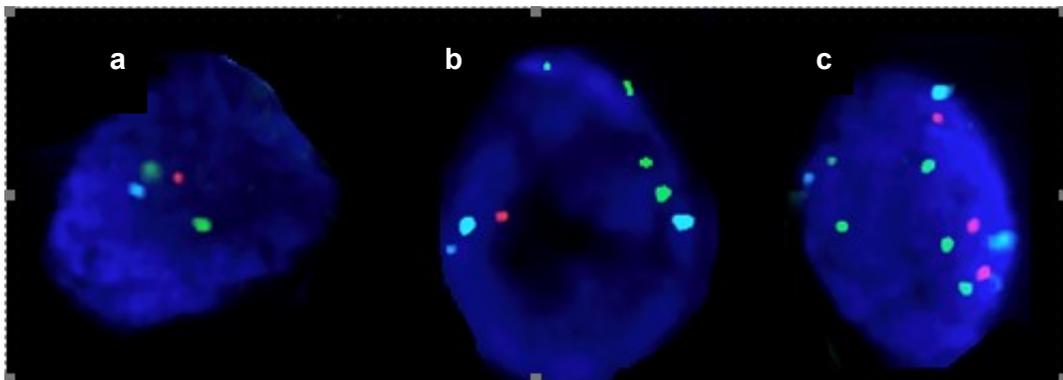
Die FISH-Analyse wurde mittels der mehrfarbigen ProVision-Sonde durchgeführt (Abbildung 12). Das Sondendesign ermöglicht die gleichzeitige Analyse der drei genomischen Marker innerhalb einer einzelnen Zelle: Zentromer 8 (CEP8; SpectrumAqua), 8p22 (LPL-Gen, SpectrumOrange) und 8q24 (c-Myc, SpectrumGreen).



**Abbildung 12:** Sondendesign der mehrfarbigen DNA-Sonde: Zentromer 8 (CEP8; SpectrumAqua), 8p22 (LPL-Gen, SpectrumOrange) und 8q24 (c-Myc, SpectrumGreen).

Die Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan) analysiert. Ausgerüstet mit einzelnen Filtern für DAPI, Spectrum Green, Spectrum Orange und Spectrum Aqua wurden in 100 Kernen pro Gewebeläsion die entsprechenden Signale gezählt.

Die CCD-Kamera (JAI M300) ermöglichte die Aufnahme von Bildern die mittels der Metasystems software (Metasystems, Altussheim, Germany) erstellt werden konnten. Bild 13 zeigt FISH-Aufnahmen von Kernen, die aus der PIN, der Atrophie und dem Karzinom eines Patienten entnommen wurden.



**Abbildung 13:** FISH-Bilder aus Atrophie, PIN and Karzinom eines Patienten: (a) Kern aus der PIN mit einem Signal für LPL (orange), einem Signal für Zentromer 8 (aqua) und zwei Signale für c-myc (grün); (b) Kern aus der Atrophie mit einem Signal für LPL (orange), drei Signale für Zentromer 8 (aqua) und vier Signale für c-myc; (c) Kern aus Karzinomgewebe mit drei Signalen für LPL (orange), vier Signale für Zentromer 8 (aqua) und vier Signale für c-myc (grün) [Yildiz-Sezer et al. 2006].

#### 2.2.3.4. Signalmuster

Basierend auf den Zählungen der Signale der chromosomalen Regionen 8p22, cen8 und 8q24 wurden sechs spezifische Signalmuster definiert [Yildiz-Sezer et al. 2006].

**Verlust 8p22:** Verlust des kurzen Armes des Chromosoms 8 beinhaltet Kerne, in denen die Signale für 8p22 im Vergleich zu den Signalen für CEP8 vermindert vorkommen und folgendes Verhältnis vorliegt :

$$\frac{\text{Signale 8p}}{\text{Signale CEP8}} < 1.$$

**Zugewinn 8q24:** Zugewinn des kurzen Armes des Chromosoms 8 beinhaltet Kerne, bei denen nur die Signale für 8q24 im Vergleich zu den Signalen für CEP8 erhöht sind und folgendes Verhältnis vorliegt:

$$\frac{\text{Signale 8q}}{\text{Signale CEP8}} > 1.$$

**Monosomie 8:** Kerne mit einem Verlust eines Chromosoms 8. Gezählt wurden je nur ein Signal für 8p22, cen8 und 8q24 (1-1-1).

**Zugewinn Chromosom 8:** Kerne mit einem Zugewinn von Chromosom 8. Gezählt wurden je drei oder mehr Signale für alle drei untersuchten Regionen. (8p, cen8, 8q = 3, 3, 3 oder 4,4,4; 5,5,5).

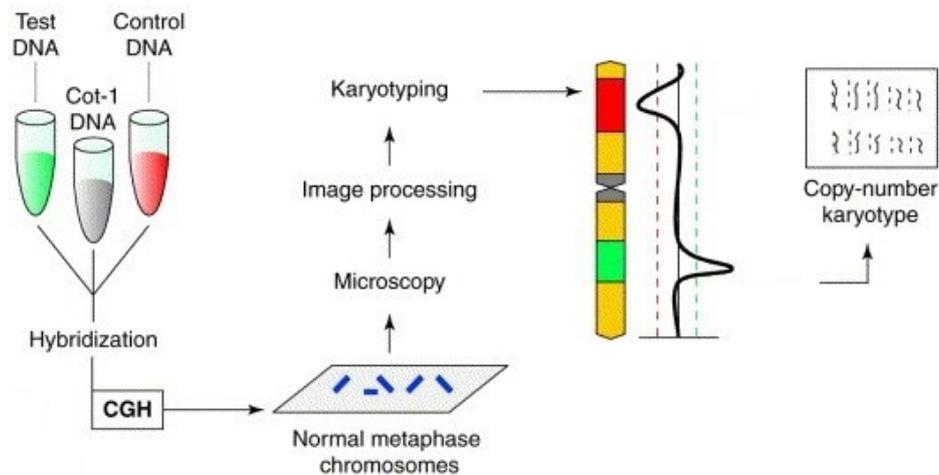
**Disomie 8:** Kerne mit je 2 Signalen für 8p22, Zentromer 8 und 8q24. Dieses Signalmuster wurde auch als „normaler Kern“ bezeichnet.

**Verlust 8p und Zugewinn 8q:** Kerne in denen ein Verlust des kurzen Armes **gleichzeitig** mit einem Zugewinn des langen Armes von Chromosom 8 auftritt. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass im Vergleich zu CEP 8 die Signale für 8p22 vermindert **und** die Signale für 8q24 erhöht sind:

$$\frac{\text{Signale 8p}}{\text{Signale CEP8}} < 1 \text{ und } \frac{\text{Signale 8q}}{\text{Signale CEP8}} > 1.$$

## 2.2.4. Vergleichende Genomische Hybridisierung

Die vergleichende genomische Hybridisierung ist eine zytogenetische Methode die am gesamten Genom zur Erfassung von chromosomalen Änderungen in Form von Verlusten und Zugewinnen der DNA-Sequenzen durchgeführt wird (Abbildung 14). Dafür werden eine Test-DNA und Referenz-DNA unterschiedlich markiert und zu gleichen Teilen auf normalen Metaphasenchromosomen hybridisiert. Chromosomale Änderungen wie Aberrationen, Duplikationen und Deletionen werden als Veränderungen im Verhältnis der beiden Flurochromintensitäten erkennbar [Kallionemi et al.1992].



**Abbildung 14:** Vereinfachtes Schema einer CGH Analyse [Tönnies 2002].

Die CGH Analyse setzt sich im Wesentlichen aus folgenden Arbeitsschritten zusammen:

- 1) DNA Isolierung
- 2) Metaphasen-Präparation,
- 3) DNA-Markierung
- 4) Hybridisierung und Denaturierung
- 5) Bildanalyse

### 2.2.4.1. DNA Isolierung

Aus Paraffinblöcken wurde mithilfe des Beechers Array Instruments, Gewebestanden im Durchmesser von 2 mm entnommen. Die von den Uropathologen markierten H&E gefärbten Gewebeschnitte wurden als Vorlage für die atrophnen Areale verwendet. Für die DNA Isolierung wurde das Paraffin Material zerkleinert, mit Xylol bei 45°C für 15 Minuten entparaffiniert und mit einer Ethanol-Reihe gewaschen. Die Andauung erfolgte mittels Lysepuffer, bestehend aus

NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub> und NaEDTA, Proteinase L und mit RNase A. Die Ausfällung der Proteine erfolgte mit Natriumchlorid. Die DNA im Überstand wurde mit EtOH bei -20°C gefällt, folgend mit 70 % EtOH gewaschen und zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in dH<sub>2</sub>O gelöst. Die DNA-Qualität wurde mittels eines Spektrophotometers überprüft. Das Material wurde anschließend bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.2. Metaphasen Präparation**

Die Metaphasen wurden aus peripheren Lymphozyten gesunder 46-XY Individuen präpariert. Nach der Proliferation in einer Kurzzeitkultur kam es zur Arretierung durch Colcemid. Gefolgt von mehreren Waschschritten kam es zur Fixierung mit Essigsäure und Methanol. Die Kerne wurden auf Objektträger aufgetropft, getrocknet und bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.3. DNA Markierung –Hybridisierung-Denaturierung**

Die Markierung der DNA erfolgte über die Nick-Translation nach Standardprotokoll. So wurde 1µg Atrophie-DNA und 1µg Referenz-DNA verwendet und mit Biotin bzw. Digoxigenin (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) markiert. Eine Sondenmischung, bestehend aus Tumor-DNA, normaler DNA, 40 µg Cot-1-DNA und 20 µg Lachssperma-DNA wurde erstellt. Die Denaturierung erfolgte 5 Minuten lang bei 75°C in 50 % Formamid, 20 % Dextransulfat, 2x SSC und 50mM Natriumphosphatpuffer. Die Objektträger wurden 3 Tage bei 37°C in einer befeuchteten Kammer hybridisiert [Yildiz-Sezer et al. 2007].

Zur Detektion der Fluoreszenz wurden die Objektträger mit Avidin-Fluorescein-Isothiocyanat (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) und Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Roche Diagnostics) behandelt. Avidin-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) färbt die biotinmarkierte DNA und Anti-Digoxigenin-Rhodamin (TRITC) die Digoxigenin gefärbte DNA. Somit wird die Analyse der Sequenzkopien ermöglicht. Die Identifizierung der Chromosomen erfolgte mit der Gegenfärbung mit DAPI und die Stabilisierung der Fluoreszenz erfolgte durch die Antifade Lösung (Vectashields, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) [Yildiz-Sezer et al. 2007].

#### **2.2.4.4. Bildanalyse**

Die Bildanalyse wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Axioplan Imaging) durchgeführt, das mit einer CCD-Kamera (JAI M300) und einer CGH-Software ISIS (Metasystem, Altusheim, Deutschland) ausgestattet war. Es wurden Filter für FITC, TRITC und DAPI verwendet [Yildiz-Sezer et al. 2007].

Pro Fall wurden mindestens 15 Metaphasen analysiert. Von jeder Metaphase wurden monochrome Bilder aufgenommen und separat abgespeichert. Die DAPI-Bilder wurden für die Identifizierung und Sortierung der Chromosomen in einem Karyogramm verwendet. Das Ratio-Bild entstand durch das Übereinanderlagern der FITC- und TRITC-Bilder und diente der Analyse der Veränderungen in den DNA Sequenzen, sowie Amplifikationen, Duplikationen oder Deletionen. Ein Fluoreszenzverhältnis von mehr als 1,2 wurde als Zugewinn der DNA-Sequenzkopienzahl und ein Fluoreszenzverhältnis von weniger als 0,8 wurde als ein Verlust der DNA-Sequenz definiert.

Perizentromere, heterochromatische Regionen, Telomerregionen und Chromosom Y wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

#### **2.2.4.5. Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung**

Um die CGH-Ergebnisse zu validieren, wurden FISH Analysen in atrophischen Bereichen und gepaarten Karzinomen unter Verwendung einer CEPX / Y-Sonde (Vysis) durchgeführt. Zur Vorbehandlung wurde das FISH -Protokoll welches für die TMAs herangezogen wurde, verwendet (Abbildung 11). So wurden die histologischen Schnitte mit Xylol entparaffiniert und mit Ethanol dehydratisiert. Die Objektträger wurden in 10 mM Citratpuffer 60 min lang bei 80 °C inkubiert, in einer Pepsinlösung (2 mg/ml) bei 37°C angedaut, in 4 % Formaldehyd fixiert und in einer Ethanolreihe dehydriert [Yildiz-Sezer et al. 2007].

Die DNA-Sonde wurde direkt auf das vorbehandelte Gewebe aufgetragen, 5 min lang bei 80°C denaturiert und 24 Stunden lang bei 37°C hybridisiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI in der Antifade-Lösung [Yildiz-Sezer et al. 2007].

Eine Anzahl von mindestens 100 Kernen wurde in jedem Gewebebereich analysiert (Bereich 101-290, durchschnittlich 173 analysierte Kerne). Die FISH-Signale wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Axioplan) bewertet, das mit spezifischen Filtersätzen ausgestattet war [Yildiz-Sezer et al. 2007].

### **2.2.5. Statistik**

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte durch die Anwendung des Students-t Tests und des Chi-Quadrat-Tests.

Der Students-t-Test ist ein statistisches Verfahren mit dessen Hilfe ein Unterschied zwischen den empirisch gefundenen Mittelwerten zweier Gruppen näher analysiert werden kann. Der t-Test arbeitet mit den Populationsparametern der Streuung und des arithmetischen Mittels. Er liefert ein statistisches Ergebnis darüber, ob ein gefundener Mittelwertsunterschied rein zufällig entstanden ist, oder ob es wirklich bedeutsame Unterschiede zwischen den zwei untersuchten Gruppen gibt [Rasch et.al 2010].

Die Mittelwerte der einzelnen Signalmuster, die durch die FISH-Analysen an Chromosome 8 erfasst wurden, wurden in gepaarten Gewebetypen verglichen. So wurde das Vorkommen von Disomie 8 in der Atrophie jeweils verglichen mit dem in der PIN, im Normalgewebe und im Karzinom. Auch die genetischen Untersuchungen an Chromosom X wurden mit diesem Verfahren analysiert. So wurde der mittels FISH Analysen detektierte Zugewinn an Chromosom X im atrophen Gewebe mit den Karzinomdaten verglichen [Yildiz-Sezer et al. 2006, Yildiz-Sezer et al. 2007]. Der ungepaarte Student-t-test [Müllner 2005] wurde für den Vergleich der Gewebeproben der tumorfreien Kontrollgruppe und den Atrophie-Läsionen der Tumorpatienten herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde bei beiden Verfahren auf 5% festgesetzt [Yildiz-Sezer et al. 2007].

Mittels dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test wurden die untersuchten Gewebeläsionen untereinander verglichen. Beim Chi-Quadrat -Test können zwei „Variable“ dahin überprüft werden ob sie stochastisch unabhängig sind [Hellbrück 2009]. So wurden je zwei Gewebetypen anhand der Chromosom 8 Signalmuster, definiert durch FISH Analysen, statistisch verglichen. Ein Signifikanzniveau von 1 % wurde festgelegt und somit ein P-Wert unter 0.01 als statistisch signifikant definiert [Yildiz-Sezer et al. 2006].

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Veränderungen an Chromosom 8

Die Suche nach genetischen Änderungen in Chromosom 8 konnte im Normalgewebe, in der Atrophie, in der PIN und in den Krebsläsionen der untersuchten 50 Patienten sowie im Prostatagewebe der Kontrollgruppe der 10 tumorfreien Patienten erfolgreich durchgeführt werden. Durch die Analyse der Signale für 8p22, Zentromer 8 und 8q24 wurden wie in Kapitel 2 beschrieben sechs verschiedene Signalmuster definiert: Verlust 8p, Zugewinn 8q, Monosomie 8, Zugewinn Chromosom 8, Disomie 8, und Verlust 8p **und** Zugewinn 8q. Die untersuchten Gewebeläsionen wurden innerhalb einzelner Kategorien verglichen. Zudem wurde ein statistischer Vergleich der Läsionen unter Einbezug aller Signalmerkmale vorgenommen [Yildiz-Sezer et.al 2006]. In der Tabelle 4 und 5 sind die Ergebnisse der FISH-Analyse und der Statistik zusammengefasst.

##### 3.1.1. Verlust 8p22

Der Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 8 bzw. des LPL Gens wurde durch die verminderte Anzahl der 8p22 Signale verglichen mit der Anzahl der Zentromer 8 Signale definiert. Die Abbildung 15 a zeigt eine FISH Aufnahme eines Kernes mit Verlust 8p22. Für alle Kerne die unter diese Kategorie fallen gilt das Verhältnis  $\frac{\text{Signale } 8p}{\text{Signale CEP8}} < 1$ . So wurden beispielsweise auch Kerne mit je drei Signalen für c-myc und Zentromere 8 und einem Signal für LPL zu Verlust 8p22 gezählt. Für jeden Gewebetyp wurde der durchschnittliche Prozentsatz der Kerne mit Verlust 8p22 ausgerechnet. In der Kontrollgruppe zeigten 3,6 % der Kerne einen Verlust 8p22 während das Signalmuster in 10,3% der Kerne im Normalgewebe, 14,2 % in der Atrophie, 17,1 % in der PIN und 21,1 % im Karzinom vorgefunden wurden [Yildiz-Sezer et.al 2006].

Der mittlere Prozentsatz der Kerne mit Verlustes 8p22 in der Atrophie war signifikant höher als im Normalgewebe und der Kontrollgruppe. Der statistische Vergleich von der Atrophie mit der PIN und dem Karzinom hingegen zeigte, dass signifikant weniger Kerne mit Verlust 8p22 in der Atrophie vorzufinden waren als in den anderen beiden Gewebetypen. Eine graduelle Erhöhung in der Anzahl der Kerne mit Verlust 8p22 konnte in der Kontrollgruppe, im Normalgewebe, in der Atrophie, in der Pin und im Karzinom festgestellt werden. In Bezug auf dieses Signalmuster unterschieden sich alle untersuchten Gewebeläsionen signifikant voneinander [Yildiz-Sezer et.al 2006].

Um das mittlere Verhältnis 8p22/CEP8 zu berechnen, wurden alle 8p22 Signale und alle CEP8 eines Patienten summiert, ins Verhältnis gesetzt und der Mittelwert berechnet. Dieser betrug im Normalgewebe 0,95 (Spw.: 0,92 bis 1,01), in der Atrophie 0,92 (Spw.: 0,79 bis 0,98) in der PIN 0,91 (Spw.: 0,83 bis 0,95) und lag im Karzinom bei 0,88 (Spw.: 0,65-0,95). In der

Kontrollgruppe mit tumorfreien Patienten wurde ein 8p22/8CEP Verhältnis von 0,96 ( $M \pm 2 \cdot SD$ ) berechnet. In 88 % der atrophischen Läsionen, konkret in 44 Fällen, lag das berechnete 8p22/8CEP Verhältnis unter dem Wert von 0,96 [Yildiz-Sezer et.al 2006].

### 3.1.2. Zugewinn 8q24

Der Zugewinn des langen Armes des Chromosoms 8 bzw. des c-myc Gen wurde durch die erhöhte Anzahl an 8q24 Signalen verglichen mit der Anzahl der Zentromer 8 Signale definiert. Die Abbildung 15 b zeigt eine FISH Aufnahme eines Kernes mit Zugewinn 8q24.

Für alle Kerne die unter diese Kategorie fallen gilt das Verhältnis  $\frac{\text{Signale } 8q}{\text{Signale } CEP8} > 1$ . So wurden auch Kerne mit einem Signal für LPL und Zentromere 8 und drei Signalen für c-myc zu diesem Signalmuster zugeordnet. Für jeden Gewebetyp wurde der durchschnittliche Prozentsatz der Kerne mit Zugewinn 8q24 berechnet [Yildiz-Sezer et.al 2006].

In der Kontrollgruppe zeigten 2,3 % der Kerne einen Zugewinn 8q24 während dieses Signalmuster in 6,1 % der Kerne im Normalgewebe, 11,5 % in der Atrophie, 12,7 % in der PIN und 15,2 % im Karzinom vorgefunden wurde. Eine graduelle Zunahme in Kernen mit Zugewinn 8q24 wurde in der Atrophie, in der PIN und im Karzinom ermittelt. Der signifikante Unterschied zeigte sich jedoch nur zwischen der Atrophie und dem Karzinom. Die PIN und die Atrophie zeigten in Bezug auf den Zugewinn 8q24 keinen signifikanten Unterschied [Yildiz-Sezer et.al 2006].

Die geringste Anzahl an Kernen mit dem Zugewinn 8q24 war in der Kontrollgruppe und im Normalgewebe vorzufinden. Der Unterschied zu den anderen Läsionen fiel deutlich aus und war statistisch signifikant ( $P < 0.001$ ) [Yildiz-Sezer et.al 2006].

Das mittlere Verhältnis 8q24 /CEP8 betrug im Normalgewebe 1,01 (Spw.: 0,98-1,08), in der Atrophie 1,05 (Spw.: 0,96-1,16) in PIN 1,06 (Spw.: 0,95-1,15) und lag im Karzinom bei 1,09 (Spw.: 1,01-1,35). Dieser wurde analog zum 8p22/CEP8 Verhältnis, aus der Summe der Signale für 8q24 und Zentromer 8 berechnet [Yildiz-Sezer et.al 2006].

In der Kontrollgruppe mit tumorfreien Patienten wurde ein 8p22/8CEP Verhältnis von 1,03 ( $M \pm 2 \cdot SD$ ) berechnet. In 66 % der atrophischen Läsionen, konkret in 33 Fällen, lag das berechnete 8p22/8CEP Verhältnis über diesem Wert von 1,03 [Yildiz-Sezer et.al 2006].

### **3.1.3. Monosomie 8**

Der Verlust eines Chromosoms 8 wurde durch das Vorkommen von je einem Signal für 8p22, CEP8 und 8q24 bestimmt. Die Abbildung 15 c zeigt eine FISH Aufnahme eines Kernes mit Monosomie 8.

Der mittlere Prozentsatz für Monosomie 8 betrug 2,7 % in der Kontrollgruppe, 5,4 % im Normalgewebe, 6,5 % in der Atrophie, 6,7 % in der PIN und 7,1 % im Karzinom. Die durchschnittliche prozentuelle Häufigkeit der Kerne mit Monosomie 8 in der Kontrollgruppe und im Normalgewebe war signifikant geringer als in der Atrophie. Der Vergleich von PIN und Karzinom mit den atrophischen Läsionen im gepaarten t-Test zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied. Somit unterscheiden sich die Atrophie, die PIN und das Karzinom in Bezug auf die Anzahl der Kerne mit Monosomie 8 nicht voneinander sind jedoch different im Vergleich zu den „normalen“ Gewebetypen [Yildiz-Sezer et.al 2006].

### **3.1.4. Zugewinn Chromosom 8**

Dieses Signalmuster ist durch das Vorhandensein von je 3 oder mehr Signalen für 8p22, CEP8 und 8q24 definiert. Es handelt sich meistens um Kerne mit Trisomie8 oder Tetrasomie 8. Weitere Polysomien kamen nur vereinzelt vor. Die Abbildung 16 a zeigt eine FISH Aufnahme eines Kernes mit Zugewinn 8. Für jeden Gewebetyp wurde der durchschnittliche Prozentsatz der Kerne mit Disomie8 berechnet [Yildiz-Sezer et.al 2006].

Der mittlere Prozentsatz von Kernen mit Zugewinn Chromosom 8 betrug 0,6 % in der Kontrollgruppe, 3,2 % im Normalgewebe, 7,2 % in der Atrophie, 7,2 % in der PIN und 9,2 % im Prostatakarzinom. Zugewinn Chromosom 8 ist in der Kontrollgruppe kaum vorzufinden, liegt jedoch höher im Normalgewebe. Der statistische Vergleich zeigt, dass die mittlere prozentuelle Häufigkeit in der Atrophie signifikant höher liegt als in der Kontrolle und im Normalgewebe. Die Anzahl der Kerne mit diesem Signalmuster ist vergleichbar mit der Anzahl in der PIN. Ein signifikanter Unterschied zwischen Atrophie und Karzinom ist durch die Definition des Alpha-Fehlers von 5 % gegeben, würde bei einer strikteren Vorgehensweise (1 %) nicht gelten [Yildiz-Sezer et.al 2006].

### 3.1.5. Disomie 8

Bei Kernen mit Disomie 8 sind je 2 Signale für 8p22, CEP8 und 8q24 vorhanden und sie gelten als Kerne mit „normalem Signalmuster“. Die Abbildung 16 b zeigt eine FISH Aufnahme eines Kernes mit Disomie 8. Für jeden Gewebetyp wurde der durchschnittliche Prozentsatz der Kerne mit Disomie 8 berechnet.

In der Kontrollgruppe zeigten 90,5 % der Kerne eine Disomie 8 während dieses Signalmuster in 72,4 % der Kerne im Normalgewebe, 56,5 % in der Atrophie, 52,2 % in der PIN und 44,2 % im Karzinom vorgefunden wurde [Yildiz-Sezer et.al 2006].

Die höchste Anzahl an Kernen war in der Kontrollgruppe und im Normalgewebe detektiert. Die statistische Auswertung zeigt, dass diese Gewebetypen sich hinsichtlich der Disomie 8 von den anderen Läsionen unterscheiden. Eine graduelle Abnahme der Kerne mit Disomie 8 wurde in Atrophie, PIN und Karzinom beobachtet. Der statistische Vergleich zeigt, dass sich die Atrophie von allen gepaarten Gewebetypen (Normalgewebe, PIN und Karzinom) sowie von der Kontrollgruppe signifikant unterscheidet [Yildiz-Sezer et.al 2006].

### 3.1.6. Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24

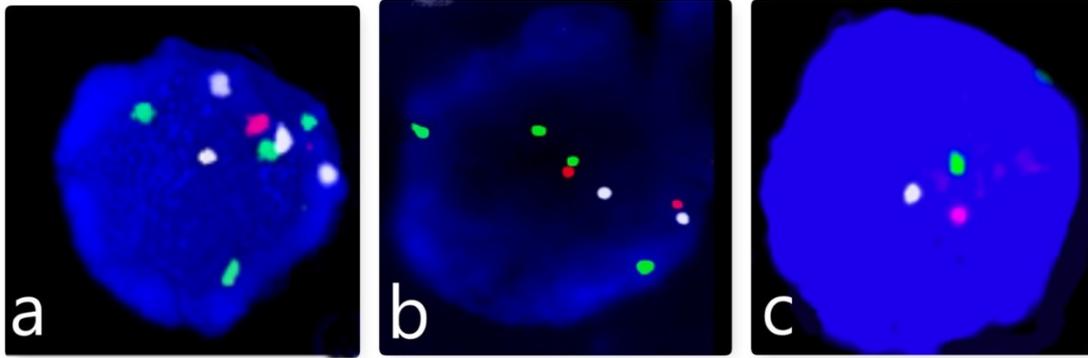
Die Kerne mit gleichzeitigem Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24 wurden durch eine verminderte Anzahl der 8p22 Signale und erhöhter 8q24 Signale auf Basis der Zentromer 8 Signale, definiert. Für alle Kerne dieser Kategorie gilt das Verhältnis:

$$\left( \frac{\text{Signale } 8p}{\text{Signale CEP8}} < 1 \text{ und } \frac{\text{Signale } 8q}{\text{Signale CEP8}} > 1 \right).$$

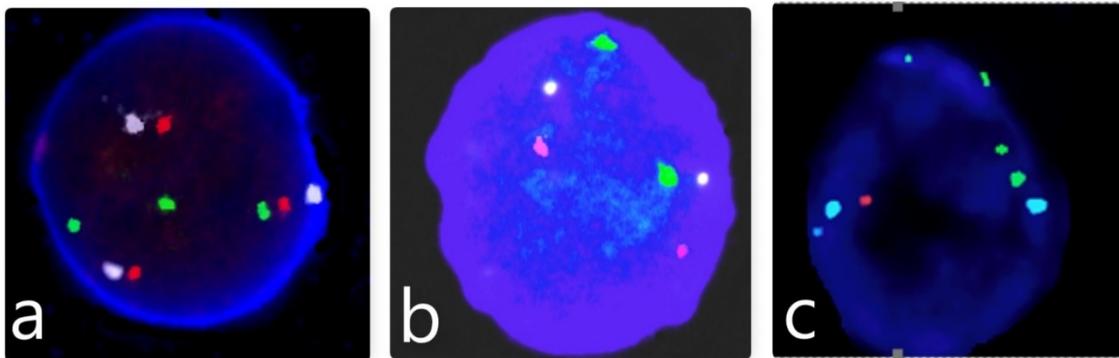
Die Abbildung 16 c zeigt eine FISH Aufnahme eines Kernes mit Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24. Für jeden Gewebetyp wurde der durchschnittliche Prozentsatz der Kerne mit Disomie 8 berechnet

In der Kontrollgruppe zeigten 0,005 % der Kerne einen Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24 während dieses Signalmuster in 0,25 % der Kerne im Normalgewebe, 0,58 % in der Atrophie, 1,49 % in der PIN und 3,06 % im Karzinom vorgefunden wurde [Yildiz-Sezer et.al 2006].

Die Anzahl der betroffenen Kerne war in allen Gewebetypen sehr niedrig und gilt als ein seltenes Ereignis. Die statistischen Analysen zeigten, dass sich die Atrophie, in Bezug auf Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24 von der Kontrolle und vom Normalgewebe nicht unterscheidet. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch beim Vergleich der Atrophie mit der PIN und dem Karzinom festgestellt werden [Yildiz-Sezer et.al 2006].



**Abbildung 15:** Kerne dargestellt mittels dem Fluoreszenzmikroskop: a) Signalmuster Verlust 8p22 mit einem Signal für LPL (SpectrumOrange), vier Signalen für Zentromer 8 (SpectrumAqua) und vier Signalen für c-myc (SpectrumGreen) b) Signalmuster Zugewinn 8q24 mit zwei Signalen für LPL, zwei Signalen für Zentromer 8 (SpektrumAqua) und 4 Signalen für c-myc (SpectrumGreen) c) Signalmuster Monosomie 8 mit einem Signal für LPL (SpectrumOrange), einem Signal für Zentromer 8 (SpectrumAqua) und einem Signal für c-myc (SpectrumGreen).



**Abbildung 16:** Kerne dargestellt mittels dem Fluoreszenzmikroskop: a) Signalmuster Zugewinn 8 mit drei Signalen für LPL (SpectrumOrange), drei Signalen für Zentromer 8 (SpectrumAqua) und drei Signalen für c-myc (SpectrumGreen) b) Signalmuster Disomie 8 mit zwei Signalen für LPL, zwei Signalen für Zentromer 8 (SpektrumAqua) und 2 Signalen für c-myc (SpectrumGreen) c) Signalmuster Verlust 8p22 und Zugewinn 8q24 mit einem Signal für LPL (SpectrumOrange), zwei Signalen für Zentromer 8 (SpectrumAqua) und drei Signalen für c-myc (SpectrumGreen).

Tissue Type	Loss 8p22	Gain 8q24	Monosomy 8
<b>Nuclei, mean %</b>			
Control	3.64	2.27	2.63
Normal	10.26	6.17	5.44
Atrophy	14.17	11.45	6.50
PIN	17.08	12.65	6.86
Cancer	21.21	15.18	7.09
<b>t, P</b>			
Control *	7.19, <0.001	5.84, <0.001	2.77, 0.008
Normal ***	6.22, <0.001	7.58<0.001	-3.10, 0.003
PIN ***	-3.89, <0.001	-1.38, 0.174	-0.47, 0.644
Cancer ***	-4.58, <0.001	-4.27, <0.001	-0.26, 0.793

Tissue Type	Gain 8	Disomy 8	8p22 loss + 8q24gain
<b>Nuclei, mean %</b>			
Control	0.58	90.52	0.005
Normal	3.24	72.40	0.25
Atrophy	7.20	56.50	0.58
PIN	7.16	52.24	1.49
Cancer	9.21	44.17	3.06
<b>t, P</b>			
Control *	4.72, 0.001	-15.8 <0.001	1.21, 0.22
Normal ***	6.98, <0.001	-15.7, <0.001	1.89, 0.06
PIN ***	-0.22, 0.83	4.72, <0.001	-3.62, <0.001
Cancer ***	-2.16, 0.04	8.51, <0.001	-4.55, <0.001
*Unpaired t-test (comparison of two independent patient groups);			
***paired t-Test (two groups with the same patients but different tissues).			

**Tabelle 4:** Der durchschnittliche Prozentsatz der Kerne mit den Signalmustern in den untersuchten Gewebetypen und der statistische Vergleich von Normalgewebe, PIN, Karzinom und PIN mit der Atrophie mittels dem Students t Test [Yildiz-Sezer et. al 2006]

### 3.1.7. Gesamtvergleich der untersuchten Läsionen

Mittels des Chi-Quadrat-Tests wurden unter Einbezug aller Signalmuster die Gewebetypen analysiert. So wurde untersucht ob sich die Läsionen in Bezug auf die Chromosom 8 Veränderungen unterscheiden.

Es wurde festgestellt, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der Atrophie und dem Gewebe der Kontrollen bzw. tumorfreien Patienten gibt. Der Vergleich zwischen der Atrophie und dem Normalgewebe, der PIN sowie dem Karzinom zeigte jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied. Vor allem der Vergleich von der Atrophie mit der PIN zeigt, dass sich diese Gewebetypen in Bezug auf die Signalmuster sehr ähnlich sind ( $p= 0.987$ ). Erwartungsgemäß unterscheidet sich das Normalgewebe signifikant vom Karzinom. Der Vergleich zeigt jedoch, dass das Normalgewebe und die PIN hinsichtlich der Chromosom 8 Veränderungen ähnlich sind [Yildiz-Sezer et. al 2006].

Tissue Type	Chi-square	P
Atrophy vs. control group	28.0	<0.001
Atrophy vs. normal	5.81	0.325
Atrophy vs. PIN	0.62	0.987
Atrophy vs. cancer	4.63	0.462
Control group vs. normal	10.0	0.074
Control group vs. PIN	33.5	<0.001
Control group vs. cancer	48.6	<0.001
Normal vs. PIN	8.71	0.121
Normal vs. cancer	18.3	0.003
PIN vs. cancer	2.46	0.783

**Tabelle 5:** Statistische Analyse mittels Chi-Quadrat-Test (5 Freiheitsgrade) der histologisch differenten Gewebetypen basierend auf die Signalmuster [Yildiz-Sezer et. al 2006]

## **3.2. Chromosom X**

### **3.2.1. CGH-Analyse**

Von den mittels CGH untersuchten 20 Atrophie-Arealen konnten 10 Fälle erfolgreich analysiert werden. In 10 der 20 Gewebestanden konnten keine Ergebnisse ermittelt werden, da das Gewebematerial für diese Untersuchung zu gering ausfiel. Nach der Präparation der Gewebeschnitte für die FISH Analyse, die zur Verifizierung der Ergebnisse durchgeführt wurde, reichte das Gewebematerial für die CGH Analyse nicht aus. Durch die CGH-Auswertung konnte in den atrophischen Läsionen der Zugewinn Chromosom X als einzige genetische Aberration auffindig gemacht werden. So konnte in 7 der 10 untersuchten Gewebeproben ein Zugewinn X festgestellt werden [Yildiz-Sezer et. al 2007]. In den Tabellen 6 und 7 sind CGH Ergebnisse angeführt und die Abbildung 17 a zeigt das CGH-Profil von Chromosom X.

### **3.2.2. FISH-Analyse**

Die FISH-Analyse konnte in 19 der 20 untersuchten Atrophie-Läsionen durchgeführt werden. Die Untersuchung der gepaarten 20 Karzinomproben und die 10 Kontrollen tumorfreier Patienten konnte vollständig abgeschlossen werden. Basierend auf die Analyse der Kontrollen wurde ein Grenzwert von 10% ( $X | + 3 \times SD$ ; 8,98 (~ 10%)) herangezogen. So wurde eine Erhöhte Anzahl von Fluoreszenzsignalen, in mehr als 10% der untersuchten Kerne, als Zugewinn Chromosom X definiert [Yildiz-Sezer et. al 2007].

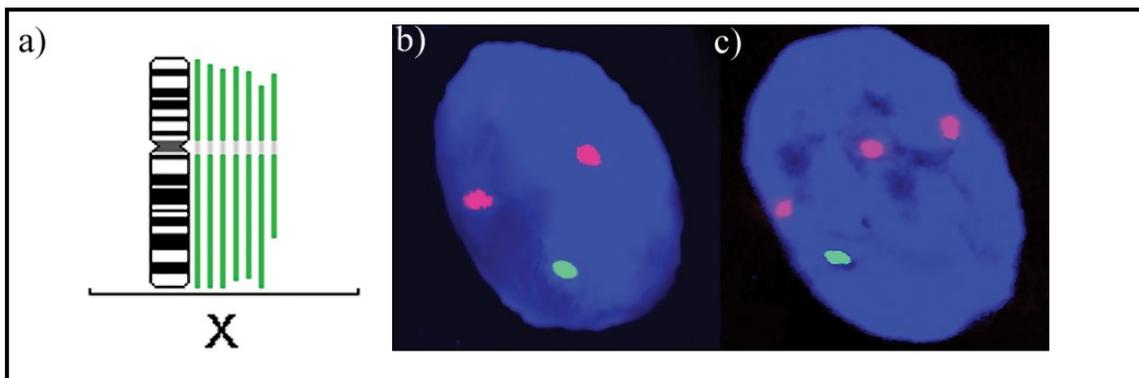
Ein Zugewinn X wurde in 13 (68,4 %) atrophischen Arealen und in 18 (90 %) Karzinomen festgestellt. In den meisten Fällen wurde das XXY Muster, das einer zusätzlichen Kopie des Chromosoms X entspricht, beobachtet. Die statistische Auswertung zeigte, dass der Zugewinn X in der Atrophie signifikant höher (P-Wert <0,001) war als in der Kontrollgruppe und niedriger (P-Wert = 0,002) als in den Karzinomproben [Yildiz-Sezer et. al 2007].

Eine Korrelation zwischen den nachweisbaren genetischen Veränderungen und den Tumorstadien der einzelnen Patienten konnte nicht festgestellt werden. Alle CGH und FISH-Ergebnisse, sowie die histopathologischen Daten sind in Tabelle 6 und 7 angegeben. Ein Beispiel einer FISH-Aufnahme der Kerne in Atrophie und Karzinom eines Patienten ist in Abbildung 17 b, c dargestellt [Yildiz-Sezer et. al 2007].

Tissues	Gain of chromosome X			
	CGH		FISH	
	No. Pat	% Pat	No. Pat	% Pat
Atrophic areas	10	70%	19	68%
Prostate cancer	n.d	n.d	20	90%
Control group	n.d	n.d	10	0%

n.d, not done; No. Pat, number of analyzed patients; % Pat, Percentage of patients with gain of chromosome X.

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der Ergebnisse der CGH und FISH Analyse [Yildiz-Sezer et. al 2007].



**Abbildung 17:** a) CGH Profile von Chromosom X in der Atrophy, Zugewinne sind als Balken auf der rechten Seite des Ideogramms sichtbar b) FISH Aufnahme eines Kernes aus der Atrophie eines Patienten mit zwei Signalen für Zentromer X (SpectrumOrange) und einem Signal für Zentromer Y (SpectrumGreen) c) Kern aus der gepaarten Tumorerläsion mit drei Signalen für Zentromer X (SpectrumOrange) und einem Signal für Zentromer Y (SpectrumGreen) [Yildiz-Sezer et. al 2007].

Patient	CGH-results atrophy	FISH-results atrophy % of nuclei with Gain X	FISH-results cancer % of nuclei with Gain X	Age	Gleason Score	TNM
1	Gain X	N/A	24.60	73	8	3
2	Gain X	32.60	51.90	67	9	3
3	Gain X	21.70	32.70	51	6	2
4	Gain X	37.60	41.70	66	7	2
5	Gain X	28.03	32.30	53	6	2
6	Gain X	45.70	42.80	60	7	2
7	Ø	11.30	13.70	43	7	2
8	Gain X	20.20	21.60	43	6	2
9	Ø	10.40	13.70	48	6	2
10	Ø	9.60	14.50	58	7	2
11	N/A	4.13	5.98	64	7	3
12	N/A	8.13	6.41	52	6	2
13	N/A	7.24	13.00	64	5	2
14	N/A	26.19	47.52	71	8	3
15	N/A	12.90	14.47	64	7	2
16	N/A	24.46	22.43	66	7	2
17	N/A	18.25	21.48	58	7	3
18	N/A	9.00	13.60	56	6	2
19	N/A	14.10	29.30	65	8	2
20	N/A	7.78	13.79	59	7	3
X  = 18.4		X  = 23.9		X  = 59.8		
(range 4.13-45.7)		(range 5.98-51.9)		(range 43-73)		

(N/A, not applicable; Ø, none of the chromosome showed gains or losses)

**Tabelle 7:** Ergebnisse der CGH und FISH Analyse und histopathologische Daten der Patienten [Yildiz-Sezer et. al 2007].

## 4. Diskussion

### 4.1. Genetische Instabilität der Prostataatrophie

Oxidativer Stress kann in der Pathogenese der Prostataatrophie und des Karzinoms eine wichtige Rolle spielen. Erhöhte Spiegel von GSTP1, GSTA1 und COX-2 in der Atrophie scheinen eine Reaktion auf die potentiellen Schäden der auftretenden ROS zu sein. Das Scheitern der Abwehrmechanismen in einigen Zellen der Prostataatrophie kann zu genetischer Schädigung und neoplastischer Transformation führen. [Pathak et al. 2005; De Marzo et al. 1999; Parsons et al. 2001; Zha et al. 2001].

Veränderungen am Chromosom 8 sind die häufigsten Veränderungen beim Prostatakarzinom. Verschiedene genetische Analysen bestätigten, dass die Regionen 8p21-22 und 8q24 am häufigsten betroffen sind [Bova et al. 1993; Kagan et al. 1995; Jenkins et al. 1998; Bostwick et al. 1998]. Deletionen von 8p22 wurden auch bei primärem und fortgeschrittenem Prostatakarzinom vorgefunden und korrelieren mit dem Tumorstadium [Sato et al. 1999]. Der Verlust von 8p22 wird allgemein als ein frühes Ereignis in der Tumorgenese von Prostata akzeptiert, da es in PIN nachgewiesen wurde [Macoska et al. 1994].

In einer vorhergehenden Untersuchung wurden erste Ergebnisse über einen Verlust von 8p22 in Epithelzellen der Atrophie-Läsionen gezeigt. Der Unterschied zu normalem Gewebe, inklusive benigne und hyperplastischen Drüsen, war statistisch nicht signifikant [Macoska et al. 2000]. Wir konstruierten Gewebemikroarrays (TMAs) von 50 Patienten mit histologisch unterschiedlichen Geweben, einschließlich normaler, PIN, Atrophie und Tumor-Läsionen. Diese Technik erlaubte es, alle Gewebe, die von einer großen Anzahl von Patienten stammten, unter denselben Bedingungen zu analysieren [Yildiz-Sezer et al. 2006].

FISH-Analysen zeigten eine kontinuierliche Zunahme der Kerne mit Verlust des kurzen Arms von Chromosom 8 in allen untersuchten Läsionen. So wurde in 14 % der atrophischen Läsionen ein Verlust von 8p22 festgestellt, was signifikant höher war als bei der Kontrollgruppe und normalem Gewebe jedoch niedriger als bei der PIN und beim Karzinom. Der Verlust des gesamten Chromosoms 8 wurde bei 6,5 % der Kerne in den atrophischen Läsionen nachgewiesen, ähnlich in PIN und im Tumorgewebe und höher verglichen mit normalem Gewebe [Yildiz-Sezer et al. 2006]. In der Studie von Macoska und Kollegen wurden höhere Zellzahlen mit einem Signalmusterverlust von 8p22 (38,9 %) und Monosomie 8 (16,3 %) vorgefunden [Macoska et al. 2000], was auf die geringe Anzahl atrophischer Areale in dieser Studie zurückzuführen ist [Yildiz-Sezer et al. 2006].

Die Amplifikation von Onkogenen ist ein Mechanismus, der zu einem sukzessiven Fortschreiten von soliden Tumoren führt und eher als ein spätes Ereignis in der Tumorgenese der Prostata gilt [Schwab und Amler 1990]. Die Verstärkung von 8q24 ist eine der häufigsten

Veränderungen bei fortgeschrittenem Prostatakrebs [Kasahara et al. 2002]. Die Zunahme von 8q24 bedeutet zusätzliche Kopien des c-myc-Gens, das bei primärem und fortgeschrittenem Prostatakarzinom und davor in 8 % der PIN-Areale mit erhöhten c-myc Kopien detektiert wurde [Jenkins et al. 1997]. Es wird angenommen, dass c-myc den Zellen im frühen Stadium der Karzinogenese einen proliferativen Vorteil verleiht, zum Wachstum beim fortgeschrittenen Tumor führt und zum androgenunabhängigem Wachstum von Prostatakrebs führt [Bernard et al. 2003].

In der vorliegenden Studie wurde ein Anstieg in der Anzahl der Kerne mit Zugewinn an 8q24 in der Kontrollgruppe (2,3 %), im normalen Gewebe (6,2 %), in atrophischen Läsionen (11,5 %), in der PIN (12,7 %) und im Karzinom (15,2 %) beobachtet. Ähnlich wie die für den Zugewinn von 8q24 war die durchschnittliche Anzahl an Kernen mit Zugewinn des gesamten Chromosom 8 in normalem Gewebe am niedrigsten, in Atrophie und PIN-Läsionen etwa doppelt so hoch und in den Tumor-Läsionen am höchsten. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen PIN und Atrophie beobachtet, weder bezüglich Zugewinn von 8q24 noch Zugewinn des gesamten Chromosoms 8. Es kann angenommen werden, dass die Veränderungen in der Anzahl von c-myc Kopien bereits in den Epithelien der atrophischen Drüsen beginnen und während der Tumorgenese fortschreiten [Yildiz-Sezer et al. 2006].

CGH-Analysen an 20 Patienten zeigten, dass 70 % der atrophischen Areale, als einzige Aberration, Kerne mit einem Zugewinn an Chromosom X aufweisen. Diese Ergebnisse stimmten mit FISH-Analysen überein. Nur atrophische Areale, die bei FISH Analysen einen Zugewinn von Chromosom X in mindestens 20 % der Kerne vorweisen, zeigten auch mit CGH Analysen einen X Zugewinn. Es überrascht daher nicht, dass Chromosomen-8-Veränderungen aufgrund der relativ geringen Anzahl der Zellen mit Alterationen (< 20 %) bei CGH-Analysen nicht nachweisbar waren [Yildiz-Sezer et al. 2007].

Der hohe prozentuale Zuwachs X bei Atrophie und bei Krebs könnte durch die geringe Anzahl (zufällig ausgewählter Prostatakrebsproben) (CGH - 10; FISH - 20) erklärt werden [Yildiz-Sezer et al. 2007].

Ein Zugewinn von Chromosom X wurde davor bei 40 bis 73 % primären Prostatakarzinome beobachtet [Brown et al. 2002; Gurek et al. 1997]. Das AR-Gen, das sich auf dem Chromosom Xq11-13 befindet, codiert das AR-Protein, welches für die intrazelluläre Regulierung des Prostatawachstums und der zellulären Differenzierung essentiell ist [Gelman 2002]. Eine zusätzliche Kopie des AR-Gens kann die Expression des Androgenrezeptors erhöhen, sodass ein geringer Anstieg der relativen Gen-Dosis biologische Bedeutung haben könnte [Linja et al. 2001]. Patienten mit Polysomie des Chromosoms X zeigten auch zusätzliche Kopien des AR-Gens [Ropke 2004].

## 4.2. Prostataatrophie als Vorläufer von PIN und Karzinom

Es ist weithin anerkannt, dass PIN die wahrscheinlichste Vorstufe von Prostatakrebs ist und zu fortgeschrittenem und hormonrefraktärem Krebs führt [Bostwick et al. 1996]. Aber die PIN ist ein morphologischer Endpunkt der intraglandulären Krebsentwicklung und hat die genaue Pathogenese dieses Tumors nicht erklärt. Bisher stammen nicht alle Krebsarten von PIN-Läsionen. Ungefähr 30 % der invasiven Prostatakarzinome werden nicht in Verbindung mit PIN gesehen [Mc Neal und Bostwick 1986].

Jahre später wurde die Hypothese von Franks [Franks 1954] neu bewertet, die andeutete, dass die Atrophie der Prostatadrüsen und die nachfolgende Proliferation der Drüsenepithelien die ursprüngliche Läsion darstellen, die sich zum Adenokarzinom entwickeln können. Der Begriff "Proliferative Inflammatorische Atrophie" (PIA) wurde eingeführt, um die Tatsache zu unterstreichen, dass die Läsion proliferativ ist und mit einer Entzündung assoziiert [De Marzo et al. 1999].

Ein neues mehrstufiges Progressionsmodell wurde eingeführt, welches die Progression von normalem Epithel zu fokaler Prostataatrophie, zur PIN und dann zum Karzinom beschreibt [De Marzo et al. 1999; Nelson et al. 2003]. Eine Reihe von Anzeichen impliziert die fokale Atrophie, bzw. nur die Atrophie mit Hyperplasie der Basalzellen als Vorstufe von PIN und Prostatakrebs.

So befinden sich die Atrophie-Läsionen vorwiegend in der peripheren Zone der Prostata in unmittelbarer Nähe zum invasiven Karzinom und gehen direkt in die PIN über [Putzi und De Marzo 2000; McNeal et al. 1988]. Das Vorhandensein von PAH korreliert mit der Existenz von PIN und wird mit einem vermutlich direkten Übergang von PAH zu PIN erklärt [Davidson et al. 2011]. Zudem zeigen atrophische Läsionen eine höhere Proliferationsaktivität und geringere Apoptoseraten, die zwischen normalem Epithel und PIN liegen [De Marzo et al. 1999; Franks 1954; Liavag 1968; Shah et al. 2001; Ruska et al. 1998; Van Leenders et al. 2003]. Diese deuten darauf hin, dass die Zellen des sekretorischen Kompartiments bei der proliferativen entzündlichen Atrophie einen unreifen sekretorischen Phänotyp aufweisen, der dem in Zellen von hochgradiger PIN und dem Karzinom ähnlich ist [Nelson et al. 2003; Billis 1998].

Die Prostataatrophie ist mit chronischer Entzündung, Alterung und Ischämie assoziiert [De Marzo et al. 1999; Liavag 1968, Shah et al. 2001; Ruska et al. 1998; Billis 1998]. Dies sind auch Ursachen für Prostatakrebs. Chronische Entzündungen und fokale Atrophie treten häufig in unmittelbarer Nähe zum Prostatakarzinom auf. Vor allem die „Proliferative Inflammatorische Atrophie“ ist häufig in Prostata vertreten die von Karzinompatienten stammen, während alle anderen Atrophie-Läsionen in der benignen Prostatahyperplasie vermehrt vorzufinden sind [Tomas et al. 2007].

Zudem wird das gleichzeitige Vorkommen von chronischer Entzündung und postatrophischer Hyperplasie (PAH) mit einem höheren Mortalitätsrisiko, verursacht durch Prostatakrebs, in Verbindung gebracht [Davidson et al. 2011].

Epigenetische Ereignisse die im Prostatakrebs und in der PIN häufig auftreten [Nakayama et al. 2003; Faith et al. 2005; Tsujimoto et al. 2002; Tsujimoto et al. 2004] wie GSTP1-Insel-Hypermethylierung, p53-Mutationen, CAG-Repeat-Polymorphismus des AR-Gens werden in der Prostataatrophie nachgewiesen.

Das Epithel der atrophischen Drüsen der Prostata sind Ziele für genetische Veränderungen, wie der Verlust 8p22, der Zugewinn 8q24 und der Zugewinn von Chromosom X. Die Aberrationen sind dieselben, die bei der PIN und dem Prostatakrebs vorkommen [Macoska et al. 2000; Yildiz-Sezer et al. 2006; Yildiz-Sezer 2007].

Die vorliegenden Untersuchungen mittels FISH und CGH können die genetische Instabilität der Zellen in den atrophischen Arealen der Prostata zeigen [Yildiz-Sezer2006; Yildiz-Sezer 2007].

#### **4.3. Offene Fragen**

Der genaue Mechanismus, der die Entwicklung von normalem Gewebe zu Prostatakrebs beschreibt, ist derzeit unklar. Prostata-Atrophie, insbesondere die Läsionen mit Hyperplasie der basalen Stammzellen, zeigen eine ausgeprägte proliferative Natur und eine Assoziation mit entzündlichen Prozessen und können eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese von Prostatakrebs spielen [Yildiz-Sezer 2007]. Die oxidative Schädigung spielt wiederum eine wichtige Rolle bei der Prostataatrophie. Die Frage, ob Entzündungen primär auftreten und zu oxidativem Stress und zu Schäden im Epithelium führen oder sekundär nach anderen Verletzungen, wie Ischämie, oxidativer Stress entsteht, ist derzeit offen [Yildiz-Sezer 2007].

Fokale proliferative Atrophie-Läsionen sind in negativen Biopsien häufig vorzufinden. Re-biopsien nach durchschnittlich 33 Monaten konnten keine Assoziation zwischen dem Vorkommen von Prostataatrophie und Karzinom zeigen. Langzeit Studien wären notwendig um die Rolle der fokalen Atrophie in der Tumorgenese beschreiben zu können [Asimakopoulos et al. 2011].

Bei Prostatakrebs wurde der Verlust von 8p22 unter Verwendung des LPL-Gens nachgewiesen, das sich an dieser Position befindet. Es ist bekannt, dass dieses Gen am Lipidstoffwechsel beteiligt ist und Polymorphismen des LPL-Gens mit Prostatakrebs assoziiert sind. Die Rolle bei der Tumorgenese des Prostatakarzinoms bedarf jedoch weiterer

Untersuchungen und könnte die Rolle des Lebensstils in diesem Neoplasma erklären [Yildiz-Sezer 2007].

Die Anzahl von Chromosom-8-Veränderungen in normalen Geweben, die von Patienten mit einem Karzinom stammen sind signifikant höher als die im Kontrollgewebe, entnommen von Patienten ohne Prostata tumor. Für praktische diagnostische Zwecke ist es notwendig zu untersuchen, ob Veränderungen von Chromosom 8 in "negativen" Prostatabiopsien, die von Patienten mit Prostata tumor stammen, nachgewiesen werden können oder nicht [Yildiz-Sezer 2007].

Genetische Untersuchungen in der aktuellen Studie haben gezeigt, dass die Zunahme des Chromosoms X häufig bei Prostatakarzinom auftritt. Das AR-Gen, das sich auf dem Chromosom X befindet, spielt vermutlich eine Schlüsselrolle in der Progression des Prostatakarzinoms. Während mehrere Studien hochgradige Amplifikationen des AR-Gens bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom zeigten, fehlen Untersuchungen zu Kopienanzahl auf niedriger Ebene. Die AR-Expression nimmt jedoch aufgrund einer zusätzlichen Kopienanzahl von AR zu. Daher ist es notwendig, auch die niedrigen Amplifikationen des AR-Gens in der Prostataatrophie, der PIN und im primären Prostatakrebs zu untersuchen [Yildiz-Sezer 2007]. Darüber hinaus sind Untersuchungen von Genveränderungen des AR-Gens in atrophischen Gebieten für die Früherkennung von Prostatakrebs, die Auswahl von Präventions- und Behandlungsstrategien erforderlich [Yildiz-Sezer 2007].

Vergleichende genomische Hybridisierung ist eine nützliche Methode, um genetische Veränderungen in Geweben zu screenen. Nur bei einer großen Anzahl an betroffenen Zellen ist eine CGH-Analyse sinnvoll. Andere Gene, die eine Rolle in der Tumorgenese spielen, jedoch eine geringere Anzahl an Kernen mit veränderten Kopien aufweisen, sind mit dieser Technik nicht nachweisbar. Es ist notwendig, alle Gene, die mit Prostatakrebs assoziiert sind, mit anderen Techniken zu untersuchen [Yildiz-Sezer 2007].

## 5. Literaturverzeichnis

- 1 Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 2000;14:2410-34.
- 2 Alers JC, Rochat J, Krijtenburg PJ, Hop WC, Kranse R, Rosenberg C, et al. Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest* 2000;80:931-42.
- 3 Anderson JR, Strickland D, Corbin D, Byrnes JA, Zweiback E. Age-specific reference ranges for serum prostate specific antigen. *Urology* 1995;46:54-57.
- 4 Anton RC, Kattan MW, Chakraborty S, Wheeler TM. Postatrophic hyperplasia of the prostate: lack of association with prostate cancer. *Am J Surg Pathol.* 1999;23:932-6.
- 5 Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 1975;15:617-31.
- 6 Arora R, Koch MO, Eble JN, Ulbright TM, Li L, Cheng L. Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 2004;100:2362-6.
- 7 Auclerc G, Antoine EC, Cajfinger F, Brunet-Pommeyrol A, Agazia C, Khayat D. Management of advanced prostate cancer. *Oncologist* 2000;5:36-44.
- 8 Bartsch G, Horninger W, Klocker H, Reissigl A, Oberaigner W, Schonitzer D, et al. Prostate cancer mortality after introduction of prostate-specific antigen mass screening in the Federal State of Tyrol, Austria. *Urology* 2001;58:417-24.
- 9 Bernard D, Poutier-Manzanedo A, Gil J, Beach DH. Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest* 2003; 112:1724-31.
- 10 Bethel CR, Faith D, Li X, Guan B, Hicks JL, Lan F, et al. Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res.* 2006;66:10683-90.
- 11 Billis A. Prostatic atrophy: an autopsy study of a histologic mimic of adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:47-54.
- 12 Bishop GA, McMillan MS, Haughton G, Frelinger JA. Signaling to a B-cell clone by Ek, but not Ak, does not reflect alteration of Ak genes. *Immunogenetics* 1988;28:184-92.
- 13 Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 2004;101:2371-490.
- 14 Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 1996;29:117-134.

- 15 Bostwick DG, Shan A, Qian J, Darson M, Maihle NJ, Jenkins RB, et al. Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with matched foci of prostate carcinoma. *Cancer* 1998;83:1995-2002.
- 16 Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJ, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res* 1993;53:3869-73.
- 17 Bratt O, Borg A, Kristoffersson U, Lundgren R, Zhang QX, Olsson. CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *Br J Cancer* 1999;81:672-6.
- 18 Brawley OW, Knopf K, Thompson I. The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. *Semin Urol Oncol* 1998;16:193-201.
- 19 Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind Ch.: TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Oxford, UK ; Hoboken, NJ : John Wiley & Sons, Inc., 2017.
- 20 Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova GS, et al. CpG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:531-6.
- 21 Brown RS, Edwards J, Dogan A, Payne H, Harland SJ, Bartlett JM, Masters JR. Amplification of the androgen receptor gene in bone metastases from hormone-refractory prostate cancer. *J Pathol* 2002;198:237-24.
- 22 Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999;59:803-6.
- 23 Carozzi F, Lombardi FC, Zendron P, Confortini M, Sani C, Bisanzi S, et al. Association of human papillomavirus with prostate cancer: analysis of a consecutive series of prostate biopsies. *Int J Biol Markers* 2004;19:257-61.
- 24 Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3367-71.
- 25 Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994;151:1283-90.
- 26 Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994;22:3181-6.

- 27 Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, et al. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res* 1996;56:3091-102.
- 28 Chin SF, Daigo Y, Huang HE et al. A simple and reliable pretreatment protocol facilities fluorescent in situ hybridisation on tissue microarrays of paraffin wax embedded tumour samples. *J Clin Mol Pathol* 2003; 56: 275-279.
- 29 Chu DC, Chuang CK, Fu JB, Huang HS, Tseng CP, Sun CF. The use of real-time quantitative polymerase chain reaction to detect hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking the GSTP1 gene to diagnose prostate carcinoma. *J Urol* 2002;167:1854-8.
- 30 Clark LC, Dalkin B, Krongrad A, Combs GF JR, Turnbull BW, Slate EH, Witherington R, et al. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol* 1998;81:730-4.
- 31 Coles B, Ketterer B The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990;25:47-70.
- 32 Correa-Cerro L, Wöhr G, Haussler J, Berthon P, Drelon E, Mangin P, et al. (CAG)<sub>n</sub>CAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French-German population. *Eur J Hum Genet* 1999;7:357-62.
- 33 Cullig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994;54:5474-8.
- 34 Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:7824-7.
- 35 Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Mol Cel Biol* 1999;19, 1 – 11.
- 36 Das D, Shah RB, Imperiale MJ. Detection and expression of human BK virus sequences in neoplastic prostate tissues. *Oncogene* 2004;23:7031-46.
- 37 Davidsson S, Fiorentino M, Andrén O, et al. Inflammation, Focal Atrophic Lesions, and Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) with Respect to Risk of Lethal Prostate Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2011;20:2280-2287.

- 38 De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JI, et al. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J Cell Biochem* 2004;91:459-77.
- 39 De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999;155:1985-92.
- 40 De Marzo AM, Platz EA, Epstein JI, Ali T, Billis A, Chan TY, et al. A working group classification of focal prostate atrophy lesions. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1281-91.
- 41 De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2007;7:256-269.
- 42 De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* 2007;7:256-269.
- 43 Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:374-383.
- 44 Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Chapter III Tumours of the prostate. IARC Press: Lyon 2004; p.158-215.
- 45 Eichholzer M, Stahelin HB, Gey KF, Ludin E, Bernasconi F. Prediction of male cancer mortality by plasma levels of interacting vitamins: 17-year follow-up of the prospective Basel study. *Int J Cancer* 1996;66:145-50.
- 46 Elo JP, Visakorpi T. Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med* 2001;33:130-41.
- 47 Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, Duray PH, Jennings SB, Florence CD, et al. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 1995;55:2959-62.
- 48 Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol* 2016;40:244–52.
- 49 Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, et al. A contemporary prostate cancer grading system: a validated alternative to the Gleason score. *Eur Urol* 2016;69:428-435.
- 50 Faith D, Han S, Lee DK, Friedl A, Hicks JL, De Marzo AM, Jarrard DF. p16 Is upregulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate. *Prostate* 2005;65:73-82.

- 51 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
- 52 Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin, DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 2010, 127: 2893–2917.
- 53 Ferlay J, Steliarova-Foucher J, Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W.W. Coebergh, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 2013,49:1374 – 1403.
- 54 Fleshner NE, Klotz LH. Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility. *Cancer Metastasis Rev* 1998-1999;17:325-30.
- 55 Franks LM. Atrophy and hyperplasia in the prostate proper. *J Pathol Bacteriol* 1954;68:617-621.
- 56 Fu W, Bubendorf L, Willi N, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G, Gasser TC. Genetic changes in clinically organ-confined prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Urology* 2000;56:880-885.
- 57 Fukumoto M, Shevrin DH, Roninson IB. Analysis of gene amplification in human tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;8518:6846-50.
- 58 Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1118-26.
- 59 Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A. Inverse association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:649-53.
- 60 Gburek BM, Kollmorgen TA, Qian J, D'Souza-Gburek SM, Lieber MM, Jenkins RB. Chromosomal anomalies in stage D1 prostate adenocarcinoma primary tumors and lymph node metastases detected by fluorescence in situ hybridization. *J Urol* 1997;157:223-7.
- 61 Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 2002;20:3001–15.
- 62 Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3320-3.
- 63 Giovannucci E. Medical history and etiology of prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001;23:159-62.
- 64 Gittes RF. Carcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1991;324:236-45.
- 65 Gleason D.F. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum. Pathol* 1992;23:273–9.

- 66 Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Schostak M, Straub B, et al. Methylation-specific PCR for detection of neoplastic DNA in biopsy washings. *J Pathol* 2002;196:331-4.
- 67 Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, De Matteo E, et al. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res* 2002;62:4876-8.
- 68 Gronberg H, Damber L, Damber JE. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol* 1994;152:1484-7.
- 69 Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 2000;42:73-8.
- 70 Hager M, Mikuz G, Bartsch G, Kolbitsch C, Moser PL. The association between local atherosclerosis and prostate cancer. *BJU Int* 2007;99:46-8.
- 71 Hammerer P, Huland H. Systematic sextant biopsies in 651 patients referred for prostate evaluation. *J Urol* 1994;151:99-102.
- 72 Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445-600.
- 73 Hayes JH, Barry MJ. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. *JAMA* 2014; 311:1143-49.
- 74 Hayes RB, Pottern LM, Strickler H, Rabkin C, Pope V, Swanson GM, et al. Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. *Br J Cancer* 2000;82:718-25.
- 75 Hayes RB, Ziegler RG, Gridley G, Swanson C, Greenberg RS, Swanson GM, et al. Dietary factors and risks for prostate cancer among blacks and whites in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999 8:25-34.
- 76 Hellbrück R. *Angewandte Statistik mit R. Gabler* | GWV Fachverlage GmbH 2009.
- 77 Henderson BE, Ross RK, Pike MC, Casagrande JT. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 1982;42:3232-9.
- 78 Henshall SM, Quinn DI, Lee CS, Head DR, Golovsky D, Brenner PC, et al. Overexpression of the cell cycle inhibitor p16INK4A in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia predicts early relapse in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:544-50.
- 79 Heshmat MY, Kaul L, Kovi J, Jackson MA, Jackson AG, Jones GW, et al. Nutrition and prostate cancer: a case-control study. *Prostate* 1985;6:7-17.
- 80 Hietanen E, Bartsch H, Bereziat JC, Camus AM, McClinton S, Eremin O, et al. Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: a case-control study. *Eur J Clin Nutr* 1994;48:575-86.

- 81 Hisada M, Rabkin CS, Strickler HD, Wright WE, Christianson RE, van den Berg BJ. Human papillomavirus antibody and risk of prostate cancer. *JAMA* 2000;283:340-1.
- 82 Ho PJ, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997 46:333-42.
- 83 Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:455-60.
- 84 Iavarone C, Wolfgang C, Kumar V, Duray P, Willingham M, Pastan I, et al. PAGE4 is a cytoplasmic protein that is expressed in normal prostate and in prostate cancers. *Mol Cancer Ther* 2002;1:329-335.
- 85 Jarrard DF, Modder J, Fadden P, Fu V, Sebree L, Heisey D, et al. Alterations in the p16/pRb cell cycle checkpoint occur commonly in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Lett* 2002;185:191-9.
- 86 Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, Yeager TR, Magrane G, Kinoshita H, et al. p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 1999;59:2957-64.
- 87 Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:5-26.
- 88 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
- 89 Jenkins R, Takahashi S, DeLacey K, Bergstralh E, Liber M. Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q, and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes Chrom Cancer* 1998;21: 131-43.
- 90 Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1997;57:524-31.
- 91 Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1747-52.
- 92 Kagan J, Stein J, Babaian RJ et al. Homozygous deletions at 8p22 and 8p21 in prostate implicate these regions as the sites for candidate tumour suppressor genes. *Oncogene* 1995;11:2121-6.
- 93 Kallioniemi OP, Visakorpi T. Genetic basis and clonal evolution of human prostate cancer. *Adv Cancer Res* 1996;68:225-55.
- 94 Kasahara K, Taquchi T, Yamasaki I, Kamada M, Yuri K, Shuin T. Detection of genetic alterations in advanced prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;137:59.

- 95 Kim SH, Kim MS, Jensen RH. Genetic alterations in microdissected prostate cancer cells by comparative genomic hybridization. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2000;3:110-114.
- 96 Kirschenbaum A, Klausner AP, Lee R, Unger P, Yao S, Liu XH, Levine AC. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. *Urology* 2000;56:671-6.
- 97 Kirschenbaum A, Liotta DR, Yao S, Liu XH, Klausner AP, Unger P, et al. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3436-41.
- 98 Konig JE, Senge T, Allhoff EP and Konig W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Prostate* 2004;58:121.
- 99 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumour specimens. *Nature Med* 1998; 4: 844-7.
- 100 Lee CT, Capodiceci P, Osman I, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, et al. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:977-83.
- 101 Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:443-50.
- 102 Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11733-7.
- 103 Liavag I. Atrophy and regeneration in the pathogenesis of prostatic carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968; 73: 338-50.
- 104 Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 2001;159:1815-26.
- 105 Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:3550-5.
- 106 Linja MJ, Visakorpi T. Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:255-64.

- 107 Lutz JM, Francisci S, Mugno E, Usel M, Pompe-Kirn V, Coebergh JW, et al. Cancer prevalence in Central Europe: the EUROPREVAL Study. *Annals of Oncology* 2003;14:313-22.
- 108 MacGrogan D, Levy A, Bostwick D, Wagner M, Wells D, Bookstein R. Loss of chromosome arm 8p loci in prostate cancer: mapping by quantitative allelic imbalance. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;10:151-9.
- 109 Macintosh CA, Stower M, Reid N, Maitland NJ. Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. *Cancer Res* 1998;58:23-8.
- 110 MacLennan GT, Eisenberg R, Fleshman RL, Taylor JM, Fu P, Resnick MI, et al. The influence of chronic inflammation in prostatic carcinogenesis: a 5-year followup study. *J Urol* 2006;176:1012-6.
- 111 Macoska JA, Beheshti B, Rhim JS, Hukku B, Lehr J, Pienta KJ, et al. Genetic characterization of immortalized human prostate epithelial cell cultures. Evidence for structural rearrangements of chromosome 8 and i(8q) chromosome formation in primary tumor-derived cells. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120:50-7.
- 112 Macoska JA, Trybus TM, Benson PD, Sakr WA, Grignon DJ, Wojno KD, et al. Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res* 1995;55:5390-5.
- 113 Macoska JA, Trybus TM, Sakr WA, Wolf MC, Benson PD, Powell IJ, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer. *Cancer Res* 1994;54:3824-30.
- 114 Macoska JA, Trybus TM, Wojno KJ. 8p22 loss concurrent with 8c gain is associated with poor outcome in prostate cancer. *Urology* 2000;55:776-82.
- 115 Madaan S, Abel PD, Chaudhary KS, Hewitt R, Stott MA, Stamp GW, et al. Cytoplasmic induction and over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. *BJU Int* 2000;86:736 -41.
- 116 Mc Neal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate *Hum Pathol* 1986;17: 54-71.
- 117 McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 1988;12:897-906.
- 118 McNeal JE, Villers A, Redwine EA, et al. Microcarcinoma in the prostate: its association with duct-acinar dysplasia. *Hum Pathol* 1991;22:644–52.
- 119 McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1988;12:619-33.
- 120 McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 1968;49:347-57.

- 121 Meirelles LR, Billis A, Cotta ACS et al. Prostatic atrophy: evidence for a possible role of local ischemia in its pathogenesis. *Int Urol Nephrol* 2002;34:45-350.
- 122 Melchior SW, Brawer MK. Role of transrectal ultrasound and prostate biopsy. *J Clin Ultrasound* 1996;24:463-471.
- 123 Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002;43:1997-2006.
- 124 Michaud DS, Augustsson K, Rimm EB, Stampfer MJ, Willet WC, Giovannucci E. A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* 2001;12:557-67.
- 125 Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL, Clark SJ. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene* 1999;18:1313-24.
- 126 Moch H, Cubilla A, Humphrey P, Reuter V, Ulbright T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *EUROPEAN UROLOGY* 2016;70:93–105.
- 127 Moore RA. The evolution and involution of the prostate gland. *Am J Pathol* 1936; 12: 599–624.
- 128 Muller-Decker K, Reinerth G, Krieg P, Zimmermann R, Heise H, Bayerl C, Marks F, et al. Prostaglandin-H-synthase isozyme expression in normal and neoplastic human skin. *Int J Cancer* 1999;82:648-56.
- 129 Müllner M. Welcher statistische Test ist der Richtige? In: *Erfolgreich wissenschaftlich arbeiten in der Klinik*. Springer Verlag 2005.
- 130 Murphy WM, Soloway MS, Barrows GH. Pathologic changes associated with androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Cancer* 1991;68:821-8.
- 131 Nag A, Smith RG. Amplification, rearrangement, and elevated expression of c-myc in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. *Prostate* 1989;15:115-22.
- 132 Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, De Marzo AM. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* 2003;163:923-33.
- 133 Narita S, Tsuchiya N, Wang L, Matsuura S, Ohyama C, Satoh S, et al. Association of lipoprotein lipase gene polymorphism with risk of prostate cancer in a Japanese population. *Int J Cancer* 2004;112:872-6.
- 134 Nelson JE, Harris RE. Inverse association of prostate cancer and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): results of a case-control study. *Oncol Rep* 2000;71:169-70.

- 135 Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol* 2004;172:6-11.
- 136 Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349:366-81.
- 137 Neugut AI, Rosenberg DJ, Ahsan H, Jacobson JS, Wahid N, Hagan M, et al. Association between coronary heart disease and cancers of the breast, prostate, and colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:869-73.
- 138 Nomura AM, Kolonel LN. Prostate cancer: a current perspective. *Epidemiol Rev* 1991;13:200-27.
- 139 Nomura AM, Stemmermann GN, Chyou PH, Henderson BE, Stanczyk FZ. Serum androgens and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:621-5.
- 140 Nupponen NN, Isola J, Visakorpi T. Mapping the amplification of EIF3S3 in breast and prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;28:203-10.
- 141 Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* 1998;153:141-148.
- 142 Oberaigner W, Horninger W, Klocker H, Schonitzer D, Stuhlinger W, Bartsch G. Reduction of prostate cancer mortality in Tyrol, Austria, after introduction of prostate-specific antigen testing. *Am J Epidemiol* 2006;15;164:376-84.
- 143 Palapattu GS, De Marzo AM, Nelson WG. The case for the role of chronic inflammation in the development of prostate cancer. *Business Briefing US Oncology Review* 2006; p 112-3.
- 144 Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis* 2005;26:1170-81.
- 145 Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996;46:5-27.
- 146 Parsons JK, Gage WR, Nelson WG, De Marzo AM. p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. *Urology* 2001;58:619-24.
- 147 Parsons JK, Nelson CP, Gage WR, Nelson WG, Kensler TW, De Marzo AM. GSTA1 expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human prostate tissue. *Prostate* 2001;49:30-7.
- 148 Pathak SK, Sharma RA b, Steward WP, et al. Oxidative stress and cyclooxygenase activity in prostate carcinogenesis: targets for chemopreventive strategies. *Eur J of Cancer* 41 2005;41:61–70.
- 149 Pierorazio PM, Walsh PC, PartinAW EpsteinJI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int* 2013;111: 753–760.

- 150 Platt N, Gordon S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest*. 2001;108:649-54.
- 151 Pollak M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001;23:59–66.
- 152 Putzi MJ, De Marzo AM. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 2000;56:828-32.
- 153 Ramon JM, Bou R, Romea S, Alkiza ME, Jacas M, Ribes J. Dietary fat intake and prostate cancer risk: a case-control study in Spain. *Cancer Causes Control* 2000;11:679-85.
- 154 Rasch B, Frieze M, Hofmann W J, Naumann E. Quantitative Methoden 1. In: Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler. Springer Verlag 2010.
- 155 Reiter RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, Davis E, et al . Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1735-40.
- 156 Reuter VE. Pathological changes in benign and malignant prostatic tissue following androgen deprivation therapy. *Urology* 1997;49: 16-22.
- 157 Ropke A, Erbersdobler A, Hammerer P, Palisaar J, John K, Stumm M, et al. Gain of androgen receptor gene copies in primary prostate cancer due to X chromosome polysomy. *Prostate* 2004;59:59-68.
- 158 Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, et al. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992;339:887-9.
- 159 Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Act*. 1998;1378:115-77.
- 160 Ruijter ET, Miller GJ, van de Kaa CA, van Bokhoven A, Bussemakers MJ, Debruyne FM, et al. Molecular analysis of multifocal prostate cancer lesions. *J Pathol* 1999;188:271-7.
- 161 Rushmore TH, Pickett CB. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem*. 1993;268:11475-8.
- 162 Ruska KM, Sauvageot J, Epstein JI. Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1073-7.
- 163 Sakamuro D, and Prendergast GC. New myc – interacting proteins: a second myc-network emerges. *Oncogene* 1999;18,2942 – 54.
- 164 Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 1994;8:439-43.

- 165 Sartor O, Zheng Q, Eastham JA. Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer. *Urology* 1999;53:378-80.
- 166 Sato K, Qian J, Slezak M et al. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1574-80.
- 167 Savic S, Bubenorf L. Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung. Eine neue diagnostische Dimension in der Zytologie; *Pathologe* 2007; 28:384–392.
- 168 Schwab M, Amler LC. Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1990;1:181-193.
- 169 Shah R, Mucci NR, Amin A, Macoska JA, Rubin MA. Postatrophic hyperplasia of the prostate gland: neoplastic precursor or innocent bystander? *Am J Pathol* 2001;158:1767-73.
- 170 Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 2004;113:160-8.
- 171 Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004;116:235-46.
- 172 Shirahama T Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2000;6:2424-30.
- 173 Siegel R L, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2016, 66: 7–30.
- 174 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2017,67:7–30.
- 175 Sjodahl R. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Extent, mode, and dose dependence of anticancer effects. *Am J Med* 2001;110:66-9.
- 176 Smogorzewska A, de Lange T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 2002;21:4338-48.
- 177 Sobin LH, Wittekind Ch (eds.). *TNM classification of malignant tumours. Sixth edition* 2002. New York. Wiley-Liss Inc, 2002: 172-5.
- 178 Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996;273:59-63.
- 179 Stanford JL, Ostrander EA. Familial prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001;23:19-23.
- 180 Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17:337-47.
- 181 Strickler HD, Goedert JJ. Sexual behavior and evidence for an infectious cause of prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001;23:144-51.

- 182 Takimoto Y, Shimazui T, Akaza H, Sato N, Noguchi M. Genetic heterogeneity of surgically resected prostate carcinomas and their biopsy specimens is related to their histologic differentiation. *Cancer* 2001;91:362-70.
- 183 Tanji N, Kikugawa T, Yokoyama M. Immunohistochemical study of cyclooxygenases in prostatic adenocarcinoma; relationship to apoptosis and Bcl-2 protein expression. *Anticancer Res* 2000;20:2313-9.
- 184 Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:252-66.
- 185 Tomas D, Krušlin B, Rogatsch H, Schäfer G, Belicza M, Mikuz G. Different Types of Atrophy in the Prostate With and Without Adenocarcinoma, *European Urology* 2007; 51:98-104.
- 186 Tsujimoto Y, Takakuwa T, Takayama H, Nishimura K, Okuyama A, Aozasa K, et al. In situ shortening of CAG repeat length within the androgen receptor gene in prostatic cancer and its possible precursors. *Prostate* 2004;58:283-90.
- 187 Tsujimoto Y, Takayama H, Nonomura N, Okuyama A, Aozasa K Postatrophic hyperplasia of the prostate in Japan: histologic and immunohistochemical features and p53 gene mutation analysis. *Prostate* 2002;52:279-87.
- 188 Van Leenders GJ, Gage WR, Hicks JL, van Balken B, Aalders TW, Schalken JA, De Marzo AM. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol* 2003;162:1529-37.
- 189 Vessella RL, Noteboom J, Lange PH. Evaluation of the Abbott IMx automated Immunoassay of prostate specific antigen. *Clin Chem* 1992;38:2044-54.
- 190 Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, et al. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1995;55:342-347.
- 191 Wechter WJ, Leipold DD, Murray ED Jr, Quiggle D, McCracken JD, Barrios RS, et al. E-7869 (R-flurbiprofen) inhibits progression of prostate cancer in the TRAMP mouse. *Cancer Res* 2000 15;608:2203-8.
- 192 Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, et al. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:652-61.
- 193 Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:4997-5001.
- 194 Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, et al. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet* 1998;20:175-179.

- 195 Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, et al. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 2002;32:321-5.
- 196 Yildiz-Sezer S, Verdorfer I, Schäfer G, Rogatsch H, Bartsch G, Mikuz G. Assessment of aberrations on chromosome 8 in prostatic atrophy. *BJU International* 2006;98:184–188.
- 197 Yildiz-Sezer S, Verdorfer I, Schäfer G, Rogatsch H, Bartsch G, Mikuz G. Gain of chromosome X in prostatic atrophy detected by CGH and FISH analyses. *Prostate* 2007;67:433-8.
- 198 Yildiz-Sezer Seval. Genetic Alterations in Prostatic Atrophy: A Precursor of Prostate Cancer. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Universität Innsbruck 2007.
- 199 Yoshimura R, Sano H, Masuda C, Kawamura M, Tsubouchi Y, Chargui J, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer*. 2000;89:589-96.
- 200 Zetter BR. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N Engl J Med* 1990;322:605-12.
- 201 Zha S, Gage WR, Sauvageot J, Saria EA, Putzi MJ, Ewing CM, et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:8617-23.
- 202 Zitzelsberger H, Engert D, Walch A, Kulka U, Aubele M, Hofler H, et al. Chromosomal changes during development and progression of prostate adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2001;84:202-8.