

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Verluste des Y-Chromosoms in urologischen Tumoren  
der Harnblase und Prostata**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Adisa Kilgus  
aus Bad Oeynhausen

Hamburg 2011

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 01.11.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter**

**Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: PD Dr. T. Schlomm**

**Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in: Prof. Dr. M. Graefen**

*Für meine Familie.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen und Fremdwörter .....</b>	<b>1</b>
<b>Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Das humane Y-Chromosom .....	3
1.1.1 Y-spezifische Gene und Erkrankungen .....	8
1.1.2 Das Vorkommen von Y-Verlusten bei malignen Erkrankungen .....	11
1.2 Das Harnblasenkarzinom .....	12
1.2.1 Ätiologie.....	12
1.2.2 Einteilung der Harnblasenkarzinome .....	13
1.2.3 TNM-Einteilung .....	14
1.2.4 Klinik, Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms .....	16
1.2.5 Prognose .....	17
1.2.6 Y-Verluste im Harnblasenkarzinom.....	17
1.3 Das Prostatakarzinom .....	20
1.3.1 Ätiologie.....	20
1.3.2 Grading nach Gleason .....	21
1.3.3 Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms .....	23
1.3.4 Klinik, Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms .....	23
1.3.5 Prognose .....	25
1.3.6 Y-Verluste in Zellen des Prostatakarzinoms .....	25
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1 Tissue-Microarrays .....	28
Herstellung eines Tissue-Microarray .....	30
2.2 Harnblasen-TMA.....	35
2.3 Prostata-TMA.....	35
Prostatakarzinom-Gewebeschnitte.....	36
2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	36
2.5 FISH-Protokoll.....	37
2.6 Statistik .....	43
<b>3 Resultate .....</b>	<b>44</b>
3.1 Harnblasen-TMA.....	44

3.2	Prostata-TMA.....	47
	Prostatakarzinom-Gewebeschnitte.....	50
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1	Möglichkeiten des TMA-Verfahrens .....	53
4.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	54
4.3	Literaturübersicht zu Y-Verlusten im Harnblasenkarzinom .....	55
	Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien .....	55
4.4	Literaturübersicht zu Y-Verlusten im Prostatakarzinom.....	57
	Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien .....	57
4.5	Y-Verluste im Normalgewebe - ein altersabhängiger Prozess? 61	
4.6	Ausblick.....	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>76</b>

## **Abkürzungen und Fremdwörter**

BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CGH	Vergleichende Hybridisierung von Patienten- und Referenz-DNA an Metaphase-Chromosomen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IHC	Immunhistochemie
IVU	intravenöse Urographie
MSY	male-spezifische Region auf dem Y-Chromosom
NRY	nicht-rekombinierende Region auf dem Y-Chromosom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSA	prostataspezifisches Antigen
RNA	Ribonukleinsäure
SRY	Sex-determinierende Region auf dem Y-Chromosom
TCC	Transitionalzellkarzinom
TMA	Tissue-Microarray
TNM	Tumor-Nodus-Metastase (Klassifikation)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World Health Organization

## **Arbeitshypothese und Fragestellung**

Die Bedeutung des Y-Chromosoms bei der Entstehung von malignen Erkrankungen ist noch immer Teil wissenschaftlicher Untersuchungen. Krebserkrankungen unterliegen einem Prozess, der unter anderem durch eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder den Verlust von Genabschnitten zustande kommen kann. Das Vorkommen von Y-Verlusten in verschiedenen malignen Tumoren spielt hierbei eine große Rolle und wurde bereits in früheren Studien untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand eines aussagekräftigen, großen Tumorkollektivs das Vorkommen von Y-Verlusten in urologischen Tumoren des Harnblasen- und Prostatakarzinoms zu klären. Hierfür soll ein bereits existierendes Gewebekollektiv von circa 3800 Prostata- und Harnblasenkarzinomen untersucht werden. Es wird ein möglicher Zusammenhang zwischen Y-Verlusten und dem Tumor-Grad, Tumor-Stadium sowie dem Patientenalter vermutet. Anhand von vorhandenen pathologisch-anatomischen Befunden und den klinischen Verlaufsdaten soll diese Hypothese gesichert werden. Um eine möglichst schnelle und effiziente Auswertung der Tumoren zu ermöglichen, wird das Tissue-Microarray-Verfahren (TMA) verwendet. Hierdurch können hunderte Tumoren auf einem TMA-Träger mikroskopisch beurteilt werden. Für die Detektion der Y-Verluste wird die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) verwendet. Fluoreszenz markierte, konventionelle DNA-Sonden erlauben eine Darstellung, Beurteilung und Auswertung der Y-Verluste unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Die Daten sollen anschließend statistisch auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Y-Verlust und Tumor-Grad, Tumor-Stadium, Patientenalter sowie Tumor-Progression ausgewertet werden.

# 1 Einleitung

Krebserkrankungen unterliegen einer Veränderung bzw. Malfunktion einzelner oder mehrerer Gene [Vogelstein und Kinzler 1998]. Es gibt verschiedene Entstehungsmechanismen. Hierzu zählen hereditäre Genveränderungen, die zu vererbtem Krebs führen können, sowie die Einwirkung von karzinogenen Faktoren, die für viele sporadische Tumoren verantwortlich gemacht werden.

In der Tumorentstehung sind zwei Gene zu nennen, die üblicherweise eine wichtige Rolle für die Regulation der Zellfunktion haben: Tumorsuppressorgene und Onkogene. Die Gruppe der Onkogene fördert das Wachstum einer Zelle. Als Gegenspieler hierzu sind die Tumorsuppressorgene zu sehen, deren Aufgabe es ist ein unkontrolliertes Zellwachstum zu verhindern und gegebenenfalls die Apoptose (Zelltod) einzuleiten. Für einen Tumor ist es daher von Vorteil, wenn Genabschnitte mitsamt Tumorsuppressorgen verloren gehen. Es wird vermutet, dass sich auf dem Y-Chromosom ein Gen mit Tumorsuppressorfunktion befindet, welches bei Verlust eine Tumorentstehung begünstigt. Diese Annahme basiert darauf, dass Y-Verluste bereits in vielen unterschiedlichen Tumortypen mittels konventionell zytogenetischen Analysen oder FISH gefunden werden konnten [Poetsch et al. 1999, Hunter et al. 1993, Bianchi 2009].

## 1.1 Das humane Y-Chromosom

Das Y-Chromosom gehört zu den Geschlechtschromosomen des Menschen und nimmt daher eine wichtige Rolle im menschlichen Genom ein. Die Geschlechtsbestimmung und Steuerung der männlichen Fertilität zählt zu seinen wichtigsten Aufgaben. Es erstreckt sich über eine Länge von bis zu 60 Millionen Basenpaaren und speichert die genetische Information auf dem kurzen (Yp) und langen Arm (Yq) des Y-Chromosoms. Verbunden werden die Chromosomenarme durch das Zentromer (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Darstellung des Y-Chromosoms und seiner pseudoautosomalen Regionen (rot). Es gibt euchromatine (gelb) und heterochromatine (schwarz) Bereiche auf dem Y-Chromosom. Das Zentromer (blau) trennt den langen Arm (Yq) vom kurzen Arm (Yp) des Chromosoms (Quelle: modifiziert nach Lahn et al. 2001).

Man geht heute davon aus, dass das X- und Y-Chromosom vor Millionen Jahren vollständig homolog zueinander waren [Graves und Schmidt 1992]. Genorte und Strukturen der Geschlechtschromosomen waren identisch und konnten sich untereinander rekombinieren. Die Entstehung des uns heute bekannten Y-Chromosoms ist zurückzuführen auf einen evolutionären Prozess. Man vermutet, dass vor circa 300 Millionen Jahren auf dem längeren Arm eines Geschlechtschromosoms die „*sex determining region of Y*“ (SRY) aus dem Gen *SOX3* hervorgegangen ist. Dies führte zur embryonalen Hodenentwicklung und somit zur ersten Unterscheidung des Y-Chromosoms vom X-Chromosom. Mit der Zeit kam es im längeren Arm dieses „Proto-Y-Chromosoms“ zu einer Inversion, wodurch sich diese Bereiche nicht mehr mit dem X-Chromosom austauschen konnten [Lahn et al. 2001]. Während das X-Chromosom sich weiterhin untereinander rekombinierte, führte die nun eingeschränkte Rekombinationsmöglichkeit beim Y-Chromosom folglich zum Genverlust. Nur die während der Evolution erhaltenen pseudoautosomalen Regionen (PAR) an den Enden des Y-Chromosoms ermöglichen weiterhin einen Genaustausch (Abbildung 1).

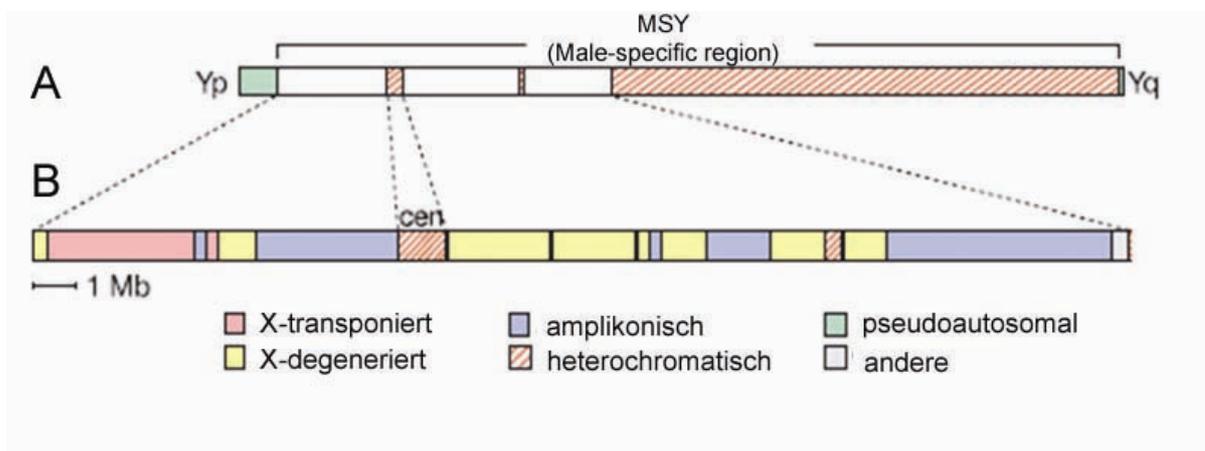
Da die pseudoautosomalen Regionen *PAR 1* und *PAR 2* mit den pseudoautosomalen Abschnitten des X-Chromosoms identisch sind, kann eine homologe Rekombination der Geschlechtschromosomen nur in diesem Bereich stattfinden [Delbridge und Graves 1999, Jobling et al. 1997]. In der Tat macht dieser Rekombinationsbereich nur circa 5 % der Gesamtlänge des Y-Chromosoms aus. *PAR 1* liegt auf dem kurzen Arm (Yp), während sich *PAR 2* auf dem langen Arm (Yq) des Y-Chromosoms befindet.

Zwischen den pseudoautosomalen Bereichen liegt die *NRV*-Region (non-recombining Region) (Abbildung 2 A). Dieser Abschnitt umfasst circa 95 % des Chromosoms und unterliegt keiner Rekombination mit dem X-Chromosom. Der *NRV*-Bereich wird auch als *male-specific-Region (MSY)* bezeichnet. Die Entwicklung dieser Y-spezifischen Genabschnitte wird durch die bereits erwähnte limitierte Rekombination des Y-Chromosoms während der Evolution erklärt [Lahn et al. 2001].

Die *MSY*-Region wird in drei Gruppen unterteilt. Vor circa drei bis vier Millionen Jahren bildete sich auf der *MSY*-Region die erste Gruppe. Durch eine massive Transposition der Gene vom X- auf das Y-Chromosom entstanden die X-transponierten Gene. Zu den X-transponierten Abschnitten gehören zwei Gene, die nicht an der Rekombination zwischen dem X- und Y-Chromosom teilnehmen. Sie sind in bis zu 99 % mit DNA-Sequenzen der Xq21-Region identisch [Skaletsky et al. 2003].

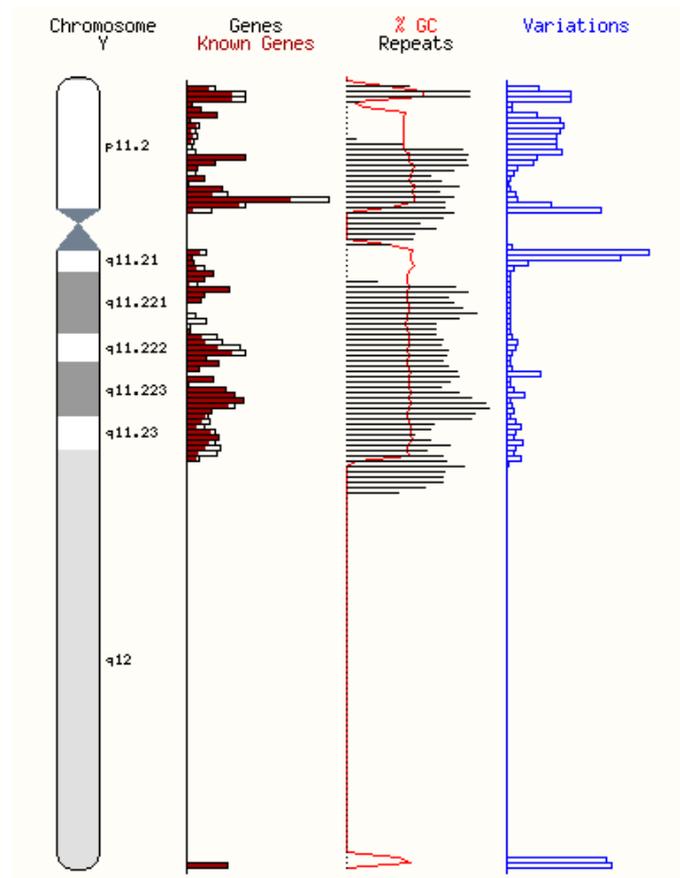
Die X-degenerierten Gene bilden die zweite Gruppe. Hierzu gehören 16 Gene, darunter das geschlechtsbestimmende *SRY*-Gen und 13 vermutlich nicht translatierte Gene (Pseudogene). Diese insgesamt 29 Gene der X-degenerierten Gruppe sind in 60 % bis 95 % mit entsprechenden Abschnitten auf dem X-Chromosom identisch.

Die dritte Gruppe wird von den amplikonischen Genen gebildet. Dieser Bereich besteht aus langen, repetitiven Sequenzen, die in bis zu 99,9 % mit anderen Sequenzen der *MSY-Region* übereinstimmen [Skaletsky et al. 2003]. Diese repetitiven Sequenzen sind dabei größtenteils hodenspezifisch und liegen als Palindrome vor, d.h. sie verhalten sich „bild- und spiegelbildlich“ zueinander. Palindrome dienen dem Y-Chromosom als Sicherheitskopie und Austauschpartner bei fehlendem Crossing-Over.



**Abbildung 2 (A)** Darstellung der MSY-Region auf dem Y-Chromosom. **(B)** Gruppeneinteilung der Gene auf dem Y-Chromosom: X-transponierte Gene, X-degenerierte Gene, amplikonische Gene (Quelle: Skaletsky et al. 2003).

Nach Angaben der aktuellen Genomannotation (Version: Ref. Genom Version 3.7, März 2010) des Ensembl-Servers befinden sich 59 kodierende Gene auf dem Y-Chromosom (Abbildung 3) [Ensembl Genome Browser]. Man geht davon aus, dass sich die Anzahl des Genvorkommens mit der Evolution drastisch reduziert hat [Bianchi 2009].



**Abbildung 3.** Das Y-Chromosom und Darstellung bekannter Gene (Quelle: [http://Mar2010.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/Chromosome?r=Y:30242636-3034263](http://Mar2010.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=Y:30242636-3034263), Stand: 12.03.2010, 17:25 Uhr).

### 1.1.1 Y-spezifische Gene und Erkrankungen

Die Kenntnis über die Y-spezifischen Gene der *MSY*-Region ist wichtig, um ihre Beteiligung an vielen Erkrankungen zu verstehen. Die Untersuchung und Aufschlüsselung dieser verschiedenen Gene erfolgte in früheren Studien vor allem anhand von Zellen des Prostatakarzinoms [Lau und Zhang 2000]. Am Beispiel des Prostatakarzinoms wird ein möglicher Zusammenhang zwischen Genveränderung und Karzinogenese vermutet [Lau und Zhang 2000]. Bekannterweise existiert ein Genlokus auf dem Y-Chromosom, der an der Entstehung des Gonadoblastomas beteiligt ist. In diesem Fall handelt es sich um den Lokus *GBY* (Gonadoblastoma auf dem Y), welcher bereits in früheren Analysen untersucht wurde [Bratt et al. 1997, Cussenot et al. 1998, Glover et al. 1998].

Die Relevanz des Y-Chromosoms und seiner Gene wird deutlich, wenn man die Auswirkung einer Inaktivität einzelner Genabschnitte betrachtet. Diese wird im Folgenden beschrieben. Derzeit ist eine Vielzahl von Genen auf der *MRY*-Region des Y-Chromosoms bekannt (Tabelle 1). In früheren Studien spielten die Y-Chromosom-spezifischen Gene vor allem in der Tumorentstehung eine Rolle [Dasari et al. 2001, Lau und Zhang 2000, Perinchery et al. 2000]. Nicht jedes Gen konnte jedoch bisher vollständig in seiner Funktion geklärt werden. In einer Polymerase-Ketten-Reaktions-Analyse (PCR) an sieben Prostata-Exemplaren entdeckten Dasari et al. [Dasari et al. 2001] eine fehlende Expression der Y-spezifischen Gene *CDY1*, *DBY*, *RBM1H*, *SRY* und *DAZ*.

**Tabelle 1.** X-Y homologe Gene und spezifische Gene des Y-Chromosoms (Quelle modifiziert nach: Dasari et al. 2001).

Gen Name	Position	Beschreibung
<b>X-Y homologe Gene</b>		
RPS4Y	Yp11.3	ribosomales Protein S4
USP9Y	YQ11.2	Ubiquitin co-terminale Hydrolase
PRKY	Yp11.2	Proteinkinase
DBY	Yq11	DEAD-Box Protein
TMSB4Y	Yq11	Thymosin beta 4
UTY	Yq11	ubiquitär transkribiert
EIF1AY	Yq11	eukaryotische Translationsinitiation
SMCY	Yq5	„Select mouse“ cDNA Y
ZFY	Yp11.3	
<b>Y-Chromosom spezifische Gene</b>		
SRY	Yp11.3	Testis determinierender Faktor
BPY1	Yq11	Testis spezifisches Basisprotein 1
BPY2	Yq11	Testis spezifisches Basisprotein 2
TSPY	Yp11.2	Testis spezifisches Protein
CDY	Y	Chromodomäne Protein
PRY	Y	PTP-BL bezogenes Y
RBMII	Yq11.23	RNA-bindendes Protein
RBMIAI	Yq11.23	RNA -bindendes Protein
RBMIH	Yq11.23	RNA-bindendes Protein
DAZ	Yq11	deletiert bei Azoospermie

Das *SRY*-Gen wurde bisher am besten untersucht. Es befindet sich auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms (*Yp11.3*). Dieses Gen triggert die embryonale Differenzierung in ein männliches Individuum durch Entwicklung der Hoden.

Perinchery et al. [Perinchery et al. 2000] untersuchten in einer PCR-Studie an 50 Prostatakarzinomen die Expression von sechs Y-spezifischen Genen (*SRY*, *ZFY*, *BPY1*, *SMCY*, *RBM1*, *BPY2*). In 38 % der Fälle lag ein Verlust des *SRY*-Gens vor. Dieser war zum Teil mit einem fortgeschrittenen Tumor-Stadium und Tumor-Grad assoziiert. Eine Untersuchung von Lau und Zhang [Lau und Zhang 2000] an Zelllinien des Prostatakarzinoms zeigte, dass dort die Expression des *SRY*-Gens vermindert war. In ihrer Studie gehen die Autoren davon aus, dass das *SRY*-Gen die Zellproliferation unterdrückt. Sie schließen daraus, dass eine verminderte Expression des Gens das Tumorwachstum fördert.

Andere Störungen des *SRY*-Gens führen zu gonadalen Dysgenesien, einem XY-Karyotyp mit weiblichem Phänotyp, welcher auch als *Swyer-Syndrom* bezeichnet wird. Die Patienten weisen sogenannte „Streak-Gonaden“ auf, welche hauptsächlich aus bindegewebigen Strängen und teils ovarialem Stroma bestehen. Daraus resultierend zeigt der Phänotyp voll ausgebildete äußere weibliche Genitalien mit jedoch fehlender Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale. 20 bis 30 % der Patienten mit Swyer-Syndrom weisen eine Deletion oder auch Punktmutation des *SRY*-Gens auf [Meschede et al. 1999]. Störungen der Funktion des *SRY*-Gens können auch zum echten Hermaphroditismus führen. Der Phänotyp dieser Patienten weist ausgeprägtes Ovarial- und Testikulärgewebe auf. Ein Großteil der Betroffenen zeigt einen 46,XX-Genotyp. Es können jedoch auch 46,XY-Genotypen auftreten, sowie ein 46, XX/46, XY-Mosaik.

Die Infertilität ist eine weitere Y-assoziierte Erkrankung des Mannes. In circa 1 von 1000 Fällen ist ein Mann infertil. Verantwortlich hierfür sind Deletionen der Y-spezifischen Genabschnitte *AZF* a, b und c (azoospermia factor region a, b und c). Eine Oligo- oder Azoospermie liegt vor allem bei Mikrodeletionen des *AZFc*-Locus vor. Doch auch andere Gen-Mikrodeletionen (*CDY*, *DAZ*, *RBM1*) können zu einer gestörten Spermatogenese führen [Lahn et al. 2001]. Die Y-spezifischen Gene *BPY1* und *BPY2* befinden sich auf dem langen Arm des Y-Chromosoms und kodieren Basis-Proteine, die hodenspezifisch sind. In der bereits erwähnten Studie von Perinchery et al. [Perinchery et al. 2000] an Prostatakarzinomen zeigte *BPY1* Deletionen in 14 % der Fälle, während *BPY2* in 42 % der Fälle betroffen war. Zu den Y-spezifischen Genen gehört auch das *TSPY*-Gen. Es wird in spermatogonialen Zellen des Hodens exprimiert und befindet sich auf dem Yp11.2-Arm des Y-Chromosoms. Mit über 20 bis 40 Kopien, die sich auf dem Y-Chromosom befinden, handelt es sich bei *TSPY* um ein Repeat-Gen [Lau 1999]. Es wird vermutet, dass das Gen die Proliferation der Keimzellen und deren Eintritt in die Meiose steuert [Schnieders et al. 1996]. Seine Bedeutung in der Entstehung von Tumoren wie dem Prostatakarzinom oder dem Gonadoblastom wurden bereits untersucht [Lau 1999]. Hierbei konnte ein Verlust des *TSPY*-Gens im Hodenkarzinom dokumentiert werden [Lau 1999, Schnieders et al. 1996]. Auch Vijayakumar et al. [Vijayakumar et al. 2006] entdeckten in einer CGH-Studie an 36 Prostatakarzinomen einen *TSPY*-Verlust in 44,4 % der Fälle. Dennoch ist seine genaue Rolle in der Tumorentstehung unklar.

Vollständige Verluste des Y-Chromosoms können zu Y-chromosomalen Erkrankungen wie dem Turner-Syndrom führen. Diese Patienten weisen einen 45,X0 Karyotyp auf. Ein großer Teil der Turner-Betroffenen stirbt jedoch bereits in utero. Die phänotypisch weiblichen Patienten fallen durch Kleinwuchs, gestörte Entwicklung der Gonaden und verschiede-

ne anatomische Anomalien auf (Cubitus valgus, tiefe posteriore Haarlinie, Herzfehler) [Li et al. 2008].

### **1.1.2 Das Vorkommen von Y-Verlusten bei malignen Erkrankungen**

Anhand einer FISH-Untersuchung an isolierten Zellen von 45 männlichen Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches konnten in 53 % der Fälle Y-Verluste entdeckt werden. Diese waren dabei in allen Tumor-Stadien vertreten [Poetsch et al. 1999]. Hunter et al. [Hunter et al. 1993] konnten in einer FISH-Studie an 29 Ösophaguskarzinomen bei 93 % der Adenokarzinome und 62 % der Plattenepithelkarzinome Y-Verluste nachweisen. Bei den Tumoren mit Y-Verlust waren die Genalterationen stark mit der Entstehung von Adenokarzinomen des Ösophagus assoziiert ( $p < 0,0001$ ). Die Autoren folgerten daraus, dass Y-Verluste eine signifikante Rolle bei der Tumorentstehung spielen. In einer CGH-Analyse von van Dekken et al. [van Dekken et al. 2001] an 20 Adenokarzinomen des Magens waren 60 % der männlichen Patienten von Y-Verlusten betroffen. Eine zytogenetische Studie an 114 Adenokarzinomen der Lunge ergab, dass 18 % der analysierten Tumoren Y-Verluste aufwiesen [Johansson et al. 1995]. Auch Center et al. [Center et al. 1993] belegten in einer zytogenetischen Untersuchung an zwölf nicht-kleinzelligen Lungentumoren Y-Verluste in 75 % der Fälle. Einen relevanten Zusammenhang mit dem Tumor-Stadium, dem Grad oder dem Patientenalter konnte nicht belegt werden. Eine chromosomale Analyse von 36 Pankreaskarzinomen mit abnormem Karyotyp ergab, dass dort in 36 % der Fälle Y-Verluste vorlagen [Kowalski et al. 2007]. Eine FISH-Studie von Missiaglia et al. [Missiaglia et al. 2002] an 14 pankreasendokrinen Tumoren zeigte ebenfalls einen Y-Verlust von 36 %. Die Autoren entnahmen ihren Ergebnissen eine signifikante Korrelation zwischen dem Geschlechtschromosomenverlust und einer Metastasierung, einer lokalen Invasion sowie einer höheren Tumorproliferationsrate. Brunelli et al. [Brunelli et al. 2003] entdeckten in einer FISH-Studie an zehn papillären Nierenzellkarzinomen Y-Verluste bei 70 % der Karzinome männlicher Patienten. Einen klinisch-pathologischen Zusammenhang fanden sie nicht.

Das Hodenkarzinom ist ebenfalls von Y-Verlusten betroffen und wurde in der Literatur bereits beschrieben [Aly et al. 1993, de Graaff et al. 1999]. Aly et al. [Aly et al. 1993] untersuchten in einer mittels FISH und Zytogenetik durchgeführten Fallstudie Zellen eines Patienten mit hochmalignem Sertoli-Zelltumor. Sie entdeckten Y-Verluste als einzige chromosomale Abnormalität. Eine Bedeutung dieser Genveränderung konnte ihre Studie nicht zeigen.

Die in unserem Institut durchgeführte, aktuelle FISH-Studie an 58 auswertbaren Tumoren des Hodenkarzinoms ergab 6,9 % Y-Verluste [Gnauck, Dissertation in progress]. Keiner der klinischen Parameter (TMA, Gefäßinvasion etc.) zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem Y-Verlust. Das kolorektale Karzinom [Bottarelli et al. 2007] weist ebenfalls ein Vorkommen von Y-Verlusten auf. Y-Verluste finden sich auch bei Patienten mit Kaposi-Sarkom. Pyakurel et al. [Pyakurel et al. 2006] konnten beispielsweise mittels Mikrodissektion, DNA-Amplifikation und FISH in einer Studie bei 87 % der 23 männlichen Patienten mit Kaposi-Sarkom Y-Verluste nachweisen. Diese wurden vor allem in frühen Formen des Kaposi-Sarkoms gefunden, während zusätzlich chromosomale Aberrationen bei spät entwickelten Formen des Sarkoms auftraten. Einen Zusammenhang zwischen hämatologischen Erkrankungen und Y-Verlusten versuchten auch Herens et al. [Herens et al., 1999] zu finden. In einer FISH-Untersuchung an Knochenmarkszellen von 1907 leukämischen und präleukämischen männlichen Patienten zeigten 3,4 % Y-Verluste. Während diese hauptsächlich nicht direkt mit dem neoplastischen Prozess assoziiert waren, zeigten sich Zusammenhänge mit dem Alter des Patienten (50–59 Jahre: 4,3 % Y-Verluste, 80–89 Jahre: 25,6 % Y-Verluste).

Es wird deutlich, dass Y -Chromosomenverluste in verschiedenen Tumoren allgemein häufig vorkommen.

## **1.2 Das Harnblasenkarzinom**

### **1.2.1 Ätiologie**

Das Harnblasenkarzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung der ableitenden Harnwege und gehört zu den siebthäufigsten Krebserkrankungen weltweit.

Der Altersgipfel dieser bösartigen Veränderung des Harnblasenepithels liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr [Sengupta et al. 2004]. Deutschlandweit erkrankten im Jahr 2006 etwa 19.360 Männer und 8.090 Frauen an einem Krebs der Harnblase [Krebs in Deutschland 2005/2006, 2010]. Männer sind dabei doppelt so häufig betroffen wie Frauen [Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI 2006]. Bekannter Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms ist vor allem der Konsum von Nikotin. Demnach haben Raucher ein bis zu vier- bis siebenfach höheres Erkrankungsrisiko als Nichtraucher [Jankovic´ und Radosavljevic´ 2007, Burch et al. 1989].

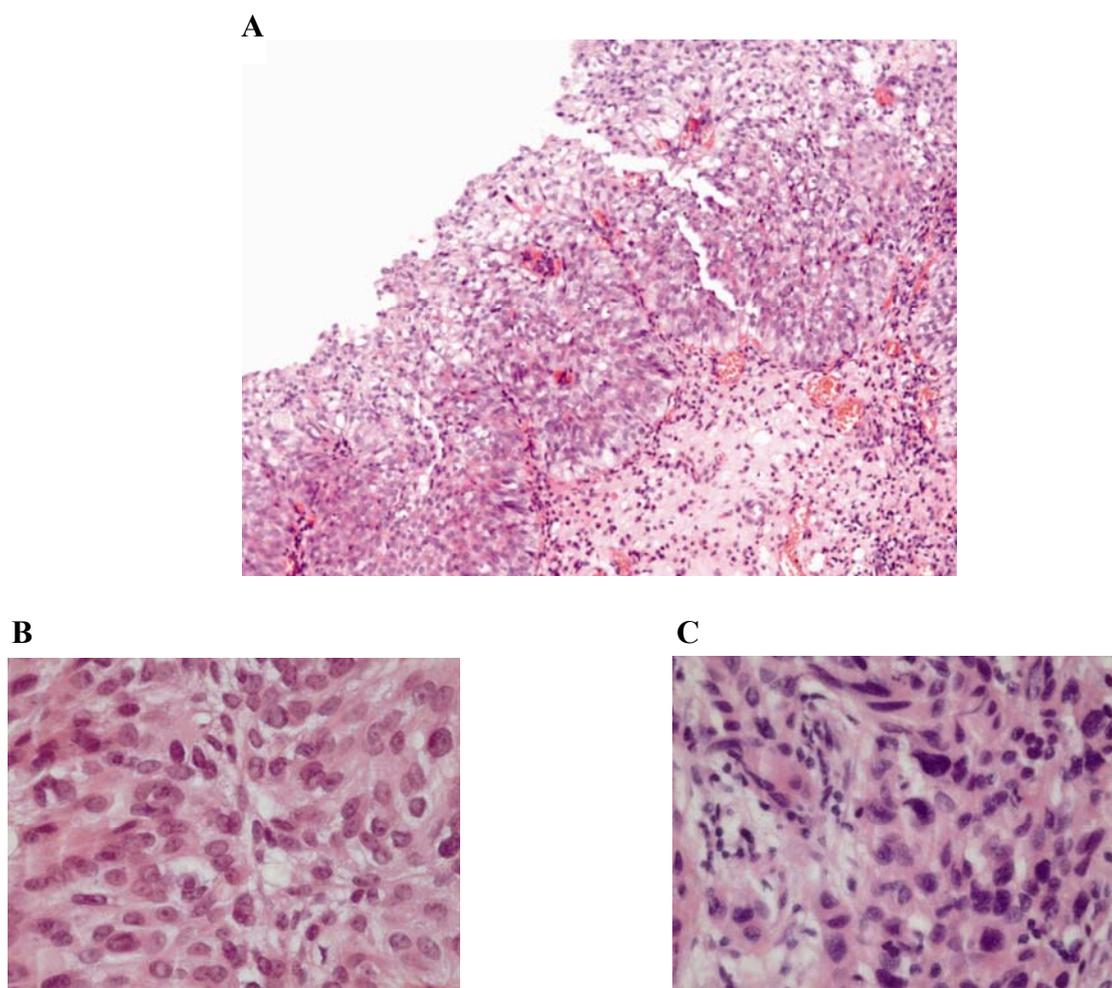
Auch die berufliche Exposition mit aromatischen Aminen ist an der Tumorgenese maßgeblich beteiligt [Eble et al. 2004]. Chronische Infektionen, die das Harnblasenepithel

irritieren, scheinen ebenfalls bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms eine Rolle zu spielen. Hierzu zählt auch die in weiten Teilen Afrikas und Asiens verbreitete chronische Zystitis, die durch *Schistosoma haematobium* bedingt ist [Lucas 1982, Hicks et al. 1977].

### 1.2.2 Einteilung der Harnblasenkarzinome

Das Harnblasenkarzinom lässt sich morphologisch in drei Typen unterteilen. Urothelkarzinome bilden mit circa 95 % die Hauptgruppe (Abbildung 4). International werden sie auch als Transitionalzellkarzinome (TCC) bezeichnet, da sie vom Übergangsepithel ausgehen.

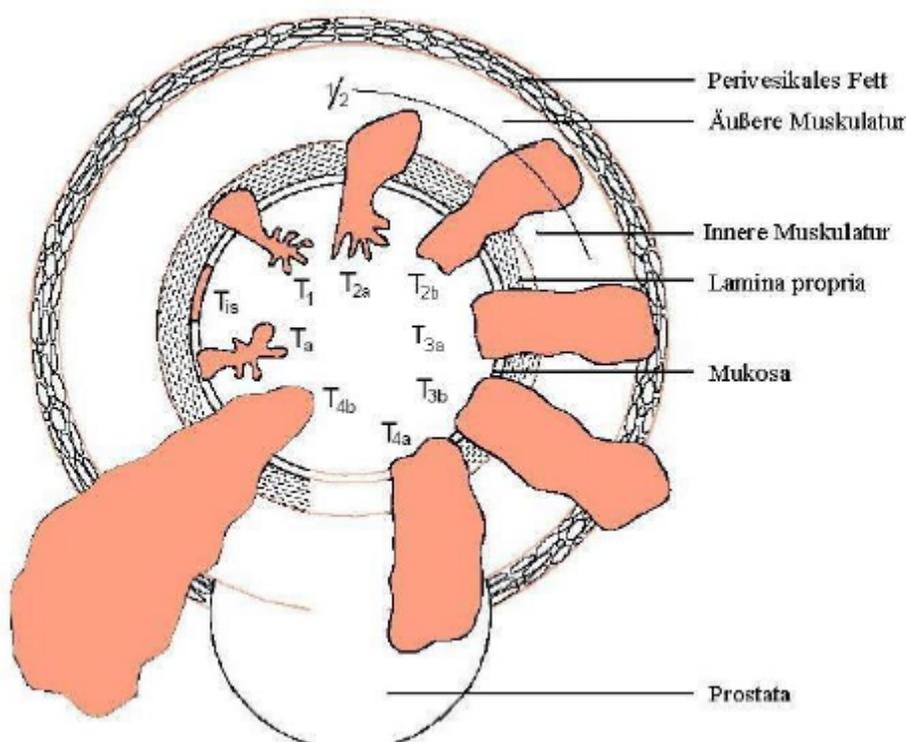
Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome sind hingegen selten vertreten (5 %). Als Sonderform des Harnblasenkarzinoms gilt das Carcinoma in situ (Cis oder Tis). Beim Carcinoma in situ handelt es sich um eine Dysplasie, die jedoch noch nicht die Lamina propria mucosae infiltriert hat (Abbildung 4).



**Abbildung 4** (A) H.E.-Färbung nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom (pTa), (B) Großaufnahme Urothelkarzinom (G2), (C) Großaufnahme Urothelkarzinom (G3).

### 1.2.3 TNM-Einteilung

Das Harnblasenkarzinom lässt sich gemäß der TNM-Klassifikation (T=Tumorgröße, N=Befall der Lymphknoten, M=Fernmetastasen) in verschiedene Tumorstadien einteilen (Abbildung 5 und Tabelle 2). Die Einteilung erfolgt dabei nach der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC). Zusätzlich wird der Differenzierungsgrad (Grading G) des Harnblasenkarzinomgewebes bestimmt. Allgemein wird zwischen oberflächlich wachsenden und infiltrierenden Karzinomen unterschieden [Oosterlinck et al. 2006]. Oberflächlich wachsende Tumoren sind dabei pTa- und pT1-Tumoren, sowie das Carcinoma in situ. Zu den infiltrierenden Tumoren gehören Tumoren der Klasse pT2 und höher.



**Abbildung 5.** Tumorausdehnung und Stadieneinteilung beim Harnblasenkarzinom [Wetterauer et al. 1995].

**Tabelle 2.** TNM-Klassifikation nach UICC (2002).*T- Primärtumor*

Ta	Nichtinvasiver papillärer Tumor
Tis	Carcinoma in situ (CIS): flacher Tumor
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T1a	Infiltration des subepithelialen Bindegewebes
T1b	Infiltration der Lamina muscularis mucosae
T1c	Infiltration über die Lamina muscularis mucosae hinaus
T2	Tumor infiltriert Muskulatur propria
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert über die Muskulatur hinaus
T3a	Mikroskopisch
T3b	Makroskopisch (extravesikale Masse)
T4	Tumor infiltriert andere Organe
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Beckenwand oder Abdominalwand

*N-Regionäre Lymphknoten(LK)*

Nx	Regionäre LK können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre LK
N1	Solitäre Lymphknotenmetastase $\leq 2$ cm
N2	Einzelne oder multiple Lymphknotenmetastase bis 5 cm
N3	Lymphknotenmetastase größer als 5 cm

*M-Fernmetastasen*

Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Gemäß der WHO-Klassifikation gibt es zusätzlich eine histopathologische Beurteilung der Zell- und Gewebedifferenzierung. Sie wird in vier unterschiedlichen Malignitätsgraden angegeben: G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (schlecht differenziert) und G4 (undifferenziert) [Sökland et al. 2002].

#### 1.2.4 Klinik, Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms

Das klinische Bild des Harnblasenkarzinoms hängt von der Ausbreitung und Lokalisation des Tumors ab. In circa 80 % der Fälle macht es sich durch eine schmerzlose Mikrohämaturie bemerkbar, welche als Leitsymptom der Erkrankung gilt. Wie bei den meisten malignen Tumoren gibt es keine eindeutigen und spezifischen Beschwerden. Ein Teil der Patienten klagt über zystische Symptomatik wie Pollakisurie, starken Harndrang und Dysurie. Bei einem bereits fortgeschrittenen Harnblasentumor können zudem Flankenschmerzen, Harnverhalt sowie Knochenschmerzen auftreten. Diese Symptome sind auf eine lokale Tumorf infiltration und Metastasierung zurückzuführen.

Die klinische Diagnostik sollte sich vor allem an der Patientenanamnese orientieren (Zigarettenkonsum, berufliche Exposition etc). Zusätzlich gibt es die Möglichkeit mittels nicht-invasiver Urin-Zytologie bzw. invasiver Zystoskopie einen genaueren Befund zu erheben. Die Urin-Zytologie stellt die nicht-invasive Variante dar. Man verwendet sie, um hochgradige Tumoren zu identifizieren. Aufgrund seiner hohen Spezifität (95 % bis 100 %), jedoch geringen Sensitivität (66 % bis 79 %) ist diese Methode in ihrer Aussagekraft für die Detektion bei asymptomatischen Patienten limitiert [Sharma et al. 2009]. Die invasive Zystoskopie ist die wichtigste Untersuchung und stellt den Goldstandard der Harnblaseninspektion dar. Sie wird üblicherweise unter Lokalanästhesie durchgeführt und kann Aufschluss über die Lokalisation und Größe des Tumors geben. Zusätzlich können verdächtige Areale mittels Fluoreszenz-Zystoskopie angefärbt werden. Hierbei wird *5-Aminolävulinsäure* intravesikal installiert, wodurch das Tumorgewebe makroskopisch anfärbt und sichtbar gemacht werden kann. Bei Auffinden einer Läsion wird diese unter Anästhesie transurethral entfernt. Zusätzlich wird bei Patienten mit Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom eine Untersuchung der oberen Harnwege mittels intravenöser *Urographie* (IVU) durchgeführt. Ein Nierenultraschall sowie eine computertomographische Urographie komplettieren die Diagnostik. Diese Untersuchungen sind für die Stadieneinteilung des Tumors wichtig und erweisen sich als hilfreich, um weitere Differentialdiagnosen einer Hämaturie auszuschließen.

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms richtet sich nach dem Stadium und Malignitätsgrad des Tumors. Die Gruppe der nicht-muskelinvasiven Tumoren (pTa) wird transurethral reseziert und engmaschig kontrolliert. Die pTaG3- und pT1-Tumoren weisen ein höheres Regressions- und Progressionsrisiko auf und müssen teilweise wiederholt reseziert oder mit Mitomycin behandelt werden. Eine weitere Therapiemöglichkeit bietet die Verwendung des abgeschwächten Stammes des *Mycobakterium bovis*.

Die Gabe des *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, welche die Tumorzellen eliminieren soll. Wiederkehrende sowie hochgradige Tumoren müssen radikal zystektomiert werden, wobei die Harnblase und Prostata des Mannes (Zystoprostatektomie), bzw. die Harnblase und Gebärmutter der Frau (Zystohysterektomie) mit entfernt werden. In einer Studie von Stein et al. [Stein et al. 2001] an 1054 Patienten mit Harnblasenkarzinom wurde gezeigt, dass durch radikale Zystektomie ein über lange Zeit erkrankungsfreies Überleben erreicht werden konnte. Bei Hochrisiko-Patienten steht zusätzlich die Möglichkeit der neoadjuvanten- und adjuvanten Chemotherapie zur Verfügung. Hier findet die Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Cisplatin Verwendung, die auch bei metastasierten Harnblasentumoren eingesetzt wird.

### **1.2.5 Prognose**

Je nach Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose variiert die Prognose bei Harnblasenkrebs. Bei Frauen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate um 70 %, während sie bei Männern um 75 % liegt. Mit einem Krebs der Harnblase, der in den vorangegangenen fünf Jahren aufgetreten war (5-Jahres-Prävalenz), lebten im Jahr 2006 insgesamt etwa 105.000 Personen, davon 80.000 Männer [Krebs in Deutschland 2005/2006, 2010].

### **1.2.6 Y-Verluste im Harnblasenkarzinom**

Derzeit sind molekulare und zytogenetische Veränderungen des Harnblasenkarzinoms im Fokus wissenschaftlicher Studien. Die klinische Bedeutung vieler Genalterationen ist jedoch größtenteils unbekannt. Dies trifft auch auf Y-Verluste zu, die in diesem Abschnitt behandelt werden. Bezüglich der prognostischen Rolle des Y-Chromosomenverlustes existieren unterschiedliche Daten. Frühere Untersuchungen am Harnblasenkarzinom wurden mittels FISH-, CGH- oder auch Zellkulturstudien durchgeführt und zeigten mit Ausnahme von Yu et al. [Yu et al. 2002] unterschiedliche Ergebnisse zwischen 10 % und 41 % (Tabelle 3).

[Fadl-Elmula et al. 2000, Neuhaus et al. 1999, Stamouli et al. 2004, Khaled et al. 2000, Zhao et al. 1999, Sauter et al. 1995, Sauter et al. 1997, Sauter et al. 1998, Powell et al. 1990, Smeets et al. 1987].

**Tabelle 3.** Auflistung der bisher veröffentlichten relevanten Studien über Y-Verluste im Harnblasenkarzinom.

Autor	veröffentlicht	Methode	n untersuchte Harnblasenkarzinome	Y-Verluste in %
Panani und Roussos	2006	FISH	35	25,7
Stamouli et al.	2004	FISH	26	26,9
Yu et al.	2002	FISH	12	83
Fadl-Emula et al.	2000	Zytogenetik	30	10
Khaled et al.	2000	FISH	17	41,2
Zhao et al.	1999	CGH	113	24
Neuhaus et al.	1999	FISH	67	34
Sauter et al.	1998	CGH	79: 28 pTa, 28 pT1 (papillär), 23 pT1-4	pTa: 28 pT1: 44,4
Sauter et al.	1997	FISH	125	23,2
Sauter et al.	1995	FISH	68	34
Powell et al.	1990	Zytogenetik	>100 (nicht genauer angegeben)	40
Smeets et al.	1987	Karyotypisierung	10	30

In einer FISH-Studie von Sauter et al. [Sauter et al. 1995] an extrahierten Zellen des Harnblasenkarzinoms entdeckte man Y-Verluste in 34 % der Fälle. Sie fanden dabei an 68 Patienten heraus, dass keine Assoziation zwischen Y-Verlust und dem Tumor-Grad oder Stadium besteht. Zwei Jahre später ergab eine ähnlich durchgeführte FISH-Studie von Sauter et al. [Sauter et al. 1997] an 125 Harnblasentumoren ebenfalls keinen Zusammenhang mit dem Tumor-Grad oder Stadium. Bei FISH-Untersuchungen an 16 Zelllinien des Transitionalzellkarzinoms (TCC) ermittelten Yu et al. [Yu et al. 2002] deutlich höhere Y-Verluste (83 %). Auch diese Studie konnte keine Relation mit dem Tumor-Grad oder Tumor-Stadium nachweisen.

Einige Studien vertreten bezüglich der Rolle des Y-Chromosoms eine andere Hypothese.

Panani und Roussos [Panani und Roussos 2006] wiesen beispielsweise in einer FISH-Untersuchung an 35 Transitionalzellkarzinomen männlicher Patienten 25,71 % Y-Verluste nach. In diesem Fall gab es einen Zusammenhang zwischen Y-Verlusten und Grad 3 Tumoren ( $p=0,023$ ).

In einer zytogenetischen Studie von Powell et al. [Powell et al. 1990] wurde der Zusammenhang zwischen Y-Verlust und Tumor-Progression untersucht. 100 Patienten mit Harnblasenkarzinom zeigten Y-Chromosomenverluste in 40 %. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Patienten mit Verlusten des Y-Chromosoms eine schnellere Tumor-Progression aufweisen als Patienten, deren Geschlechtschromosomen intakt waren.

Ein ebenfalls wichtiger Parameter ist der Zusammenhang zwischen Y-Verlust und Patientenalter. Guttenbach et al. [Guttenbach et al. 1995] untersuchten mittels in-situ-Hybridisierung (ISH) Lymphozytenzellkerne von 138 männlichen Patienten mit Harnblasenkarzinom. Die Untersuchung ergab, dass ein Y-Verlust mit steigendem Patientenalter zunimmt (Vergleich: 15. Lebensjahr: 0,05 %, 80. Lebensjahr: 1,34 %). Diesen Zusammenhang bestätigten auch Sauter et al. [Sauter et al. 1995] in ihrer Studie an 68 Harnblasenkarzinomen. Die Tumoren zeigten Y-Verluste in 34 %, wobei das Patientenalter in Karzinomen mit Y-Verlust höher war (73,5 Jahre  $\pm$  12,0 Jahre) als in Tumoren ohne Y-Verlust (66,6 Jahre  $\pm$  10,8 Jahre).

Im Gegensatz dazu zeigte die Studie von Betz et al. [Betz et al. 1996] an 35 männlichen Patienten keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Y-Chromosomenverlust und Patientenalter auf. Frühere Studien bestätigen dies [Sandberg 1992a, Neuhaus et al. 1999]. Im Fokus der Untersucher stand ebenfalls die Prognose für Patienten mit Harnblasenkarzinom. Sandberg [Sandberg 1992a] nahm bereits 1992 nach Analyse früherer Studien an, dass Patienten mit Y-Verlust eine schlechtere Prognose aufweisen, als Patienten ohne Verlust dessen.

Im Jahr 2004 entdeckten Stamouli et al. [Stamouli et al. 2004] in ihrer FISH-Analyse an 26 Harnblasentumoren männlicher Patienten Y-Verluste in 26,9 %. Die Studie ergab, dass Patienten mit einem seltenen Adenokarzinom eine schlechtere Prognose aufwiesen, als Patienten, die an einem Transitionalzellkarzinom erkrankten.

## 1.3 Das Prostatakarzinom

### 1.3.1 Ätiologie

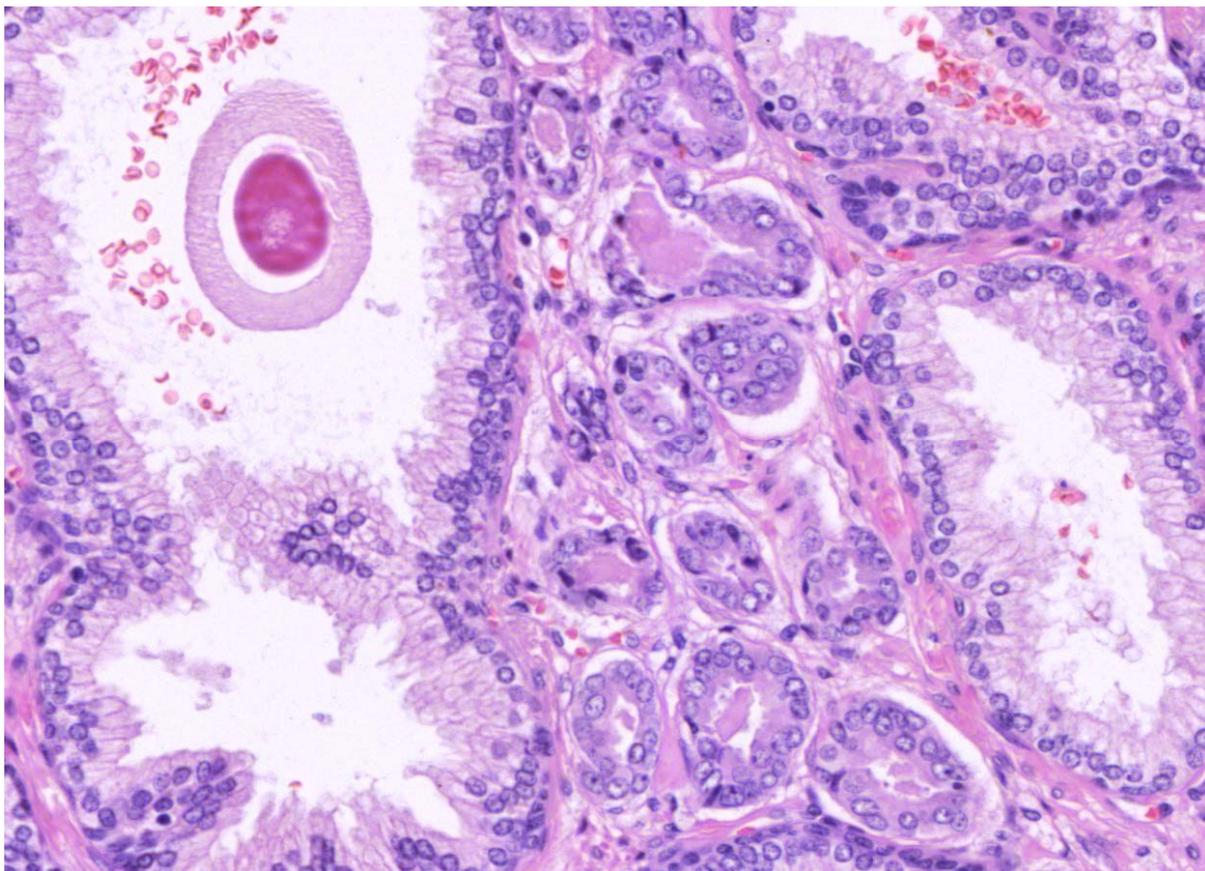
Nach dem 70. Lebensjahr ist das Prostatakarzinom der häufigste aller bösartigen Tumoren männlicher Patienten. Bei der männlichen Bevölkerung des Westens zählt es zu den am häufigsten diagnostizierten malignen Tumoren. Nach dem Bronchial- und Kolonkarzinom steht das Prostatakarzinom bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen an dritter Stelle. Nach Angaben des Robert Koch-Instituts traten im Jahr 2002 knapp 49.000 Neuerkrankungen auf [Krebs in Deutschland 2005/2006, 2010]. Die Inzidenz beträgt circa 120 pro 100.000 Männer [Rohde et al. 2007].

Zu den bekannten Faktoren, die die Entstehung eines Prostatakarzinoms auslösen können, gehören das Alter des Patienten, seine Rasse sowie seine genetische Disposition. Das mittlere Erkrankungsalter von Betroffenen liegt hier bei etwa 69 Jahren. Vor dem 50. Lebensjahr treten derartige Erkrankungen dagegen kaum auf [Krebs in Deutschland 2005/2006, 2010].

Ein Einfluss von Erbfaktoren auf die Entstehung des Prostatakarzinoms lässt sich durch eine unterschiedliche Häufigkeit des Karzinoms in verschiedenen ethnischen Gruppen vermuten. Im asiatischen Raum ist die Inzidenz beispielsweise weitaus niedriger als in Nordamerika oder Europa, während sie bei Afro-Amerikanern am höchsten ist.

Eine positive Familienanamnese spielt in der Entwicklung eines Prostatakarzinoms ebenfalls eine große Rolle. Zwar unterliegen nur circa 5-10 % aller Prostatakarzinome einer erblichen Disposition, jedoch weisen Männer, deren Verwandte 1. Grades an einem Prostatakarzinom erkrankt sind, ein doppelt so großes Erkrankungsrisiko auf [Hayes et al. 1995, Whittemore et al. 1995, Steinberg et al. 1990].

Das Prostatakarzinom geht meist von der peripheren Zone aus und wächst in das Zentrum der Prostata ein [Sökeland et al. 2002]. Etwa 98 % der Prostatakarzinome sind Adenokarzinome (Abbildung 6). Einen Anteil von circa 2 % bilden Plattenepithelkarzinome, adenoid-zystische Karzinome, muzinöse und intraduktal-papilläre Karzinome sowie Transitionalkarzinome.

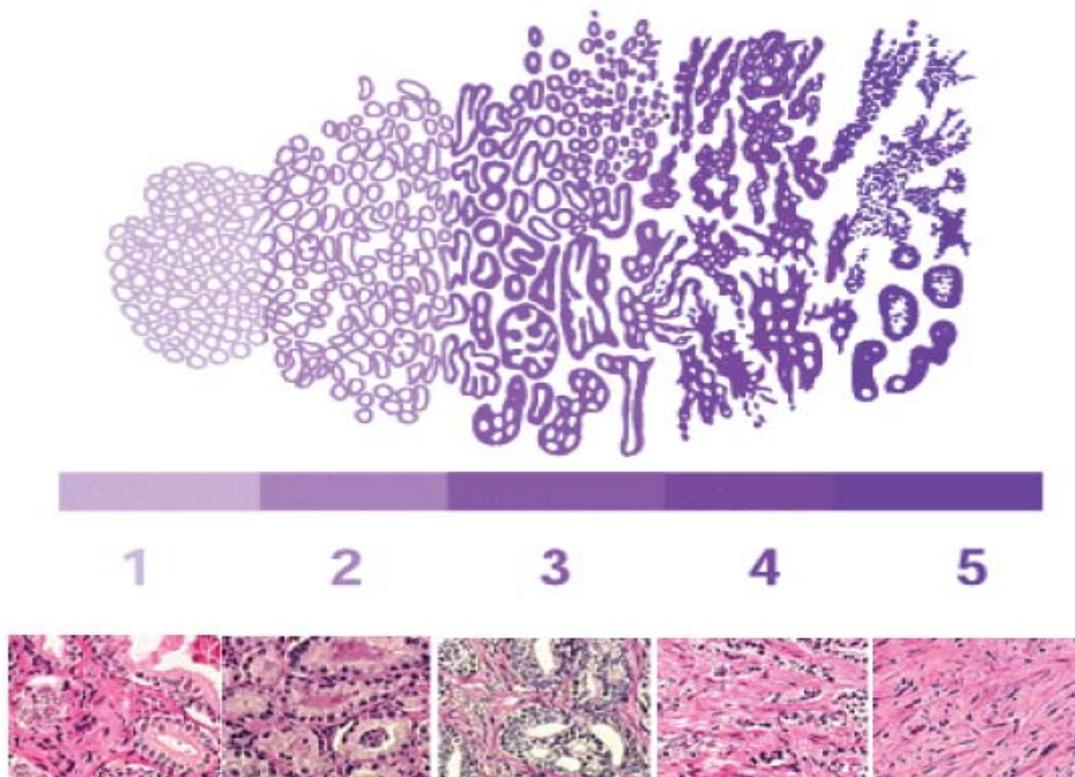


**Abbildung 6.** Adenokarzinom der Prostata (Gleason 3+3).

### 1.3.2 Grading nach Gleason

Um den Malignitätsgrad von Prostatakarzinomen zu bestimmen und eine prognostische Bewertung abgeben zu können wird das internationale Grading nach *Gleason* verwendet. Das von Donald Gleason im Jahr 1966 entwickelte Grading-System richtet sich nach den verschiedenen Wachstumsmustern des Prostatakarzinoms. Diese lassen sich durch die abnehmende Differenzierung des Karzinoms und den Verlust der histologischen Architektur charakterisieren.

Dabei werden ein primäres Muster und ein weiteres sekundäres Muster unterschieden, welche wiederum in fünf Untergruppen aufgeteilt werden. Über ein Punktesystem werden beide Muster addiert. Das Karzinom mit der höchsten Differenzierung (frühes Krebsstadium) erhält dabei den geringsten Wert ( $1+1=2$ ). Mit zunehmendem Verlust von Differenzierung und histologischer Architektur kann dieser Wert bis zu einem hochmalignen Tumor steigen ( $5+5=10$ ). Der Zusammenhang zwischen der Struktur des Karzinoms und dessen Bewertung wird im Gleason-Grading veranschaulicht (Abbildung 7).



**Abbildung 7.** Darstellung des von Gleason entworfenen Gleason-Gradings. Jede Stufe (1-5) ist einem Differenzierungsgrad des Tumors zugeordnet (entnommen aus Center, <http://www.upmccancercenters.com/cancer/prostate/gradingsystems.html>, Stand: 31.01.2011, 17.07 Uhr).

### 1.3.3 Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom lässt sich je nach Ausbreitung der Krebszellen gemäß der TNM-Klassifikation in 4 verschiedene Stadien unterteilen (T1-4):

<p><b>T Lokale Ausdehnung des Primärtumors</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Tx Primärtumor kann nicht beurteilt werden</li> <li>■ T0 Kein Hinweis auf Primärtumor</li> <li>■ T1 Klinisch inapparenter Primärtumor, nicht palpabel oder durch bildgebende Verfahren nachweisbar           <ul style="list-style-type: none"> <li>– T1a Inzidenteller Tumor: histologisch in 5% des Resektionsgewebes</li> <li>– T1b Inzidenteller Tumor: histologisch in 5% des Resektionsgewebes</li> <li>– T1c Tumor identifiziert durch Nadelbiopsie bei erhöhtem PSA-Wert</li> </ul> </li> <li>■ T2 Primärtumor beschränkt auf Prostata           <ul style="list-style-type: none"> <li>– T2a Tumor befällt ≤50% eines Seitenlappens</li> <li>– T2b Tumor befällt &gt;50% eines Seitenlappens</li> <li>– T2c Tumor befällt beide Seitenlappen</li> </ul> </li> <li>■ T3 Primärtumor überschreitet die Prostatakapsel           <ul style="list-style-type: none"> <li>– T3a Extrakapsulärer Tumor</li> <li>– T3b Tumor infiltriert die Samenblase(n)</li> </ul> </li> <li>■ T4 Primärtumor ist fixiert oder infiltriert benachbarte Strukturen</li> </ul>	<p><b>N Regionäre Lymphknoten</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden</li> <li>■ N0 Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen</li> <li>■ N1 Regionärer Lymphknotenbefall</li> </ul>
	<p><b>M Fernmetastasen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden</li> <li>■ M0 Kein Anhalt für Fernmetastasen</li> <li>■ M1 Vorliegen von Fernmetastasen           <ul style="list-style-type: none"> <li>– M1a Extraregionärer Lymphknotenbefall</li> <li>– M1b Knochenmetastasen</li> <li>– M1c Andere Manifestationen</li> </ul> </li> </ul>

Abbildung 8. TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der UICC (2002) (Quelle: Rübben 2007).

### 1.3.4 Klinik, Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms

Durch sein langsames Wachstum unterscheidet sich das Karzinom der Prostata von anderen Tumoren. Zunächst breitet es sich innerhalb der Prostata aus und infiltriert angrenzende Organe wie die Samenblase, die Harnblase oder das Rektum. Auf dem lymphogenen Metastasierungsweg werden vor allem die retroperitonealen Lymphknoten erreicht, während hämatogen hauptsächlich die Wirbelsäule befallen wird. Durch das äußerst langsame Wachstum des Prostatakarzinoms, bleibt es klinisch lange Zeit unauffällig, wobei Betroffene im Frühstadium der Erkrankung zunächst keinerlei Beschwerden aufweisen. Die Symptome Dysurie und Hämaturie zeigen sich erst bei fortgeschrittenem Tumorwachstum als Folge der

Urethraverengung. Zusätzlich können Rückenschmerzen im Spätstadium des Karzinoms auftreten, was auf eine fortgeschrittene Knochenmetastasierung zurückzuführen ist.

Für die Therapie sowie Prognose des Prostatakarzinoms ist die Erfassung des symptomlosen Initialstadiums entscheidend. Neben der präventiven digital-rektalen Untersuchung spielt auch die laborchemische Bestimmung des *prostataspezifischen Antigens* (PSA) im Serum eine große Rolle. Das von Wang et al. 1979 [Wang et al. 1979] erstmals isolierte und von den Prostatadrüsen gebildete PSA ist seit seiner Einführung ein entscheidender Bestandteil der frühzeitigen Entdeckung des Prostatakarzinoms. Dadurch wird eine rechtzeitige Therapie ermöglicht [Kumar et al. 2003].

Bei der Therapie des Prostatakarzinoms sind verschiedene Behandlungsmöglichkeiten gegeben. Sie richten sich danach, ob das Karzinom lokal begrenzt vorliegt oder bereits Metastasen gebildet hat. Somit muss zwischen einer *kurativen* und einer *palliativen* Therapie unterschieden werden. Bei lokal begrenztem Prostatakarzinom ist die radikale Prostatektomie (Entfernung der gesamten Prostata) die Methode der Wahl. Hierbei werden die Prostata, die Samenbläschen sowie regionale Lymphknoten entfernt. Operationsrisiken können sich beim Patienten durch eine postoperative Inkontinenz sowie eine erektile Dysfunktion bemerkbar machen. Um diese Risiken zu vermeiden wenden spezielle Zentren, wie die *Martini-Klinik Hamburg*, eine besonders nervenschonende Operationstechnik an.

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit des Prostatakarzinoms ist die Strahlentherapie. Hierbei kann die Bestrahlung von außen oder auch von innen mittels Brachytherapie durchgeführt werden. Bei dieser Art der Therapie werden radioaktiv geladene Metallstifte („Seeds“) in die Prostata implantiert.

Bei dem metastasierten Prostatakarzinom werden palliative Therapieverfahren angewendet. Man versucht hierbei einer weiteren Tumorausbreitung hormonell oder auch systemisch entgegenzuwirken. Die hormonelle Therapie basiert auf der Tatsache, dass konzentrationsabhängige Testosteronspiegel das Tumorwachstum beeinflussen können [Klocker et al. 1994]. Um das Tumorwachstum zu reduzieren macht man sich diese Androgen-Abhängigkeit des Tumors in einer anti-androgenen Therapie zu Nutze. Dennoch ist der direkte Einfluss erhöhter Testosteronwerte auf das Prostatakarzinom noch nicht vollständig geklärt und bietet noch immer Grundlage für Diskussionen [Sperling et al. 2004]. Demnach können sowohl erhöhte, erniedrigte, als auch normale Testosteronwerte bei alterskorrelierten Studien an Patienten mit Prostatakarzinom vorkommen [Meikle et al. 1989].

### 1.3.5 Prognose

Die Prognose des Prostatakarzinoms richtet sich nach der Ausbreitung des Tumors. Ein lokalisiertes Tumor-Stadium zeigt die günstigste Lebenserwartung. Patienten, die an kleinen, kapselinternen sowie hochdifferenzierten Karzinomen erkranken haben insgesamt gute Überlebenschancen. Seit 1980 verbesserten sich die Überlebenschancen für Patienten mit Prostatakarzinom erheblich, was auch auf die Möglichkeiten zur Früherkennung zurückzuführen ist. Um eine genauere Prognose erstellen zu können eignet sich der PSA-Wert, der Gleason-Score sowie das Tumor-Stadium.

In Deutschland liegen die relativen 5-Jahresüberlebensraten mit Prostatakarzinom zwischen 83 % und 94 %. Im Jahr 2006 lebten in Deutschland circa 238.500 Männer mit der Diagnose Prostatakrebs, die ihnen fünf Jahre zuvor gestellt wurde (5-Jahres-Prävalenz) [Krebs in Deutschland 2005/2006, 2010].

Mit zunehmendem Wissen über die Entstehung, Entwicklung und das Fortschreiten des Karzinoms auf genetischer Ebene wird es eventuell möglich sein, zwischen indolentem und aggressivem Prostatakarzinom auf molekularer Ebene zu unterscheiden [Hughes et al. 2005].

### 1.3.6 Y-Verluste in Zellen des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom und seine zytogenetischen Veränderungen wurden bereits in unterschiedlichen Studien untersucht. Man vermutet, dass sowohl somatische als auch vererbte genetische Alterationen eine große Rolle in der Ätiologie des Prostatakarzinoms spielen [Schaid et al. 1998]. Sandberg [Sandberg 1992b] nimmt an, dass genetische Veränderungen in soliden Tumoren entweder das vollständige Chromosom oder spezifische Teile dessen betreffen.

Die Bedeutung des Y-Chromosoms und seiner Verluste im Prostatakarzinom ist dennoch unklar. In einigen Studien wurden unterschiedliche Methoden verwendet, beispielsweise wie die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) [Alers et al. 2000, Haapala et al. 2001]. Die dort gefundenen Y-Verluste variierten zwischen 14 % und 89 %. In anderen Untersuchungen fand die FISH-Methode Verwendung, in der Y-Verluste zwischen 2,2 % bis 53 % im Prostatakarzinom beschrieben wurden [Nadal et al. 2007, Jordan et al. 2001, Tricoli 1999, König et al. 1994, König et al. 1996, Takahashi et al. 1996, Breitkreuz et al. 1993] (Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Auflistung der bisher veröffentlichten relevanten Studien über Y-Verluste im Prostatakarzinom.

Autor	veröffentlicht	Methode	n untersuchte Prostatakarzinome	Y-Verluste in %
Nadal et al.	2007	FISH	17	53
Celep et al.	2003	Zytogenetik	19	32
Dasari et al.	2001	PCR-Analyse	7	keine Expression der Y-spezifischen Gene: CDY1, DBY, RBMIH, SRY, DAZ
Haapala et al.	2001	Zellkultivierung, CGH und Karyotypisierung	14	89
Jordan et al.	2001	FISH	40	Yp: 35 Yq: 10
Perinchery et al.	2000	PCR-Analyse	50	SRY: 38 ZFY: 18 BPY1: 14 SMCY: 52 RBM1: 32 BPY2: 42
Alers et al.	2000	CGH	56	14
Tricoli et al.	1999	FISH	42	4,8
König et al.	1996	FISH	46	14
Takahashi et al.	1996	FISH	181	2,2
Alers et al.	1995	Interphase in-Situ-Hybridisierung (ISH)	25	20
König et al.	1994	FISH	42	53
Baretton et al.	1994	Nicht-isotopische-in-Situ-Hybridisierung (NISH)	35	2,8
Breitkreuz et al.	1993	Zytogenetik, Flow -Zytometrie, Fish	24	33
Brothman et al.	1990	Zytogenetik	30	3,33

Obwohl zahlreiche Studien Y-Verluste im Prostatakarzinom entdeckten, konnten viele Forschergruppen keinen eindeutigen Zusammenhang mit dem klinischen Stadium beziehungsweise einer Prognose bestätigen. Eine stark erhöhte Y-Verlustrate beschreibt beispielsweise die CGH-Studie von Haapala et al. [Haapala et al. 2001] an 14 hormonrefraktären Prostatakarzinomen. Hier zeigte sich nach Karyotypisierung der Chromosomen ein Y-Verlust in 89 %. Eine Relevanz der gefundenen Genalteration lag in diesem Fall nicht vor. Andere Studien beschrieben weitaus niedrigere Y-Verluste zwischen 2,8 % und 32 % [Baretton et al. 1994, Brothmann et al. 1990, Celep et al. 2003].

Während diese Gruppen keinen signifikanten Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern nachweisen konnten, zeigten König et al. [König et al. 1996] in ihrer FISH-Studie, dass mehr Y-Verluste in bereits metastasierten Tumoren auftraten. In ihrer Untersuchung an 46 Prostatakarzinomen entdeckten sie einen Verlust der Chromosomen 1, 7, 8, 10 und 18 sowie des Y-Chromosoms in 14 % der Fälle.

Jordan et al. [Jordan et al. 2001] war es im Rahmen ihrer FISH-Analyse an 40 Prostatakarzinomen sogar möglich eine genaue Lokalisation des Y-Verlustes anzugeben. Demnach lagen die Genalterationen vor allem auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms (Yp) (35 %). Zehn der Tumoren wiesen ein T3-Stadium oder höher auf. Die Y-Verluste wurden dabei auch in benignem hyperplastischen Prostatagewebe (BPH) entdeckt, welches an die Karzinomareale angrenzte.

Auch Nadal et al. [Nadal et al. 2007] wiesen in einer FISH-Untersuchung an 17 Prostatakarzinomen, 25 normalen Prostatageweben und 21 Samenblasen von Patienten mit Prostatakarzinom Y-Verluste nach. Die Exemplare des Prostatakarzinoms zeigten einen Y-Verlust von 53 %. Die nicht-malignen Samenblasen waren ebenfalls stark von Y-Verlusten betroffen (76,2 %).

Eine weitere Gruppe setzte sich vor allem mit Y-spezifischen Genen im Prostatakarzinom auseinander, um mögliche Alterationen zu entdecken. Demnach wiesen Perinchery et al. [Perinchery et al. 2000] mit Hilfe einer PCR-Untersuchung an 50 Prostatakarzinomen eine signifikante Abnahme der Expression von sechs Y-Chromosom-spezifischen Genen nach. Einige Verluste zeigten dabei eine höhere Inzidenz bei Tumoren mit steigendem Gleason-Grad und Stadium im Vergleich mit Tumoren geringeren Stadiums oder Grades.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tissue-Microarrays

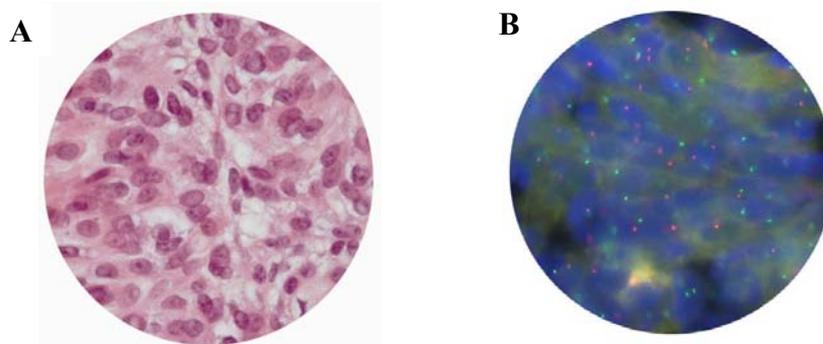
Die Entstehung und Entwicklung von Krebserkrankungen beruht auf mannigfaltigen, genetischen Veränderungen. Die Fortschritte der heutigen Medizin erlauben eine gezielte Untersuchung spezifischer Gene, die an der Kanzerogenese maßgeblich beteiligt sind. Es gibt eine Vielzahl von Methoden, die jedoch auch ihre Grenzen aufweisen. Für das Northern-Blot-Verfahren und die PCR-Methode werden zum Beispiel disintegrierte Gewebe genutzt. Hierbei können jedoch Zelltypen, die ein bestimmtes Gen exprimieren, nicht identifiziert werden. Dies führt zu Problemen, da Gene oft in verschiedenen Gewebeloki, wie Stroma- oder Tumorzellen, exprimiert werden [Simon und Sauter 2002].

Einen entscheidenden Vorteil stellt daher die in-situ-Technologie dar. Hierzu zählen die Immunhistochemie (IHC), die in-situ-Hybridisierung (ISH) oder die FISH-Methode. Mit Hilfe dieser Verfahren ist eine Untersuchung der molekularen Epidemiologie möglich. Die früheren Großflächen-in-situ-Analysen waren umständlich und ermöglichten eine nur langsame Auswertung. Um die Nachteile dieser Techniken zu überwinden, wurde 1998 die TMA-Technik von Kononen et al. [Kononen et al. 1998] entwickelt. Mit Hilfe dieser Methode können bis zu 1000 verschiedene Gewebeproben parallel auf einem Objektträger begutachtet und analysiert werden. Jeder Gewebespot enthält dabei abhängig vom Gewebetyp bis zu 500 Zellen [Simon und Sauter 2002].

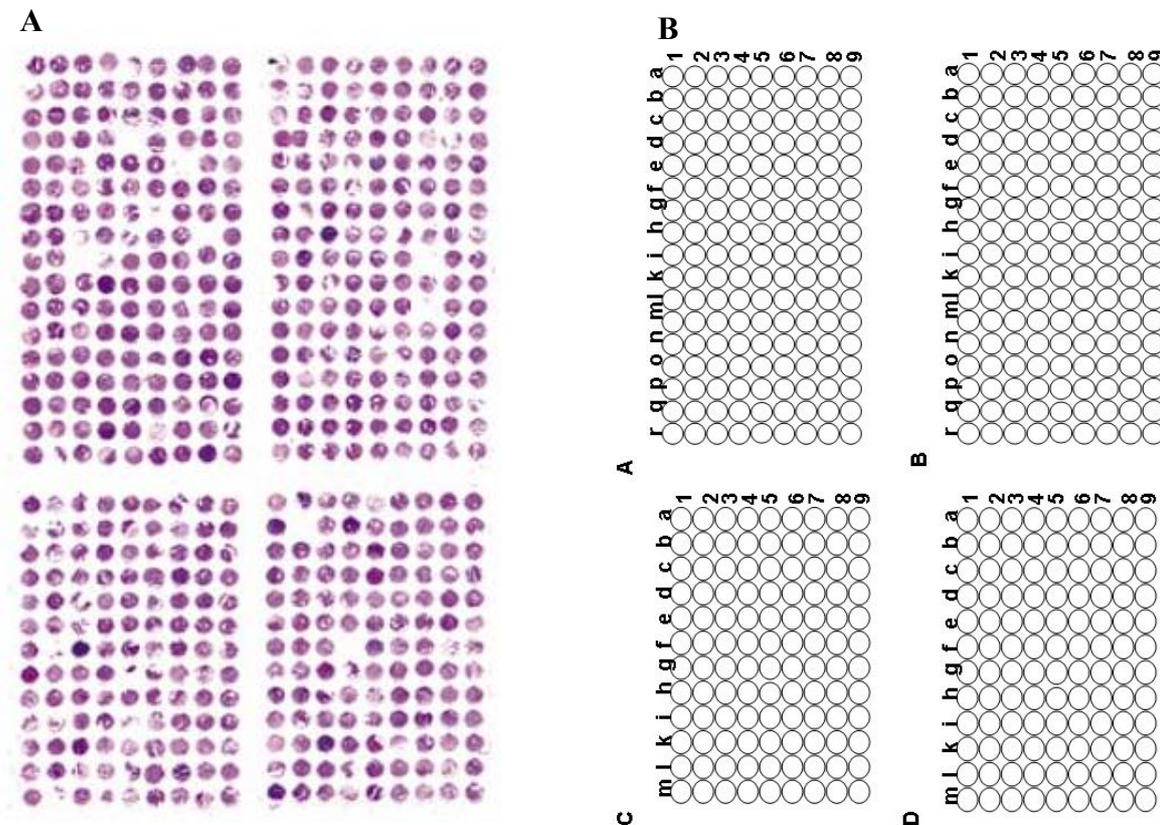
Die Verfügbarkeit von gut charakterisierten Geweben mit klinischen Verlaufsdaten ist das Kernstück der TMA-Technologie. Es zeigte sich, dass ein Gewebespot mit einem Durchmesser von circa 0,6 mm einen repräsentativen Teil eines Großflächenschnittes darstellt. Hierdurch kann eine Genalteration mit dem klinischen Verlauf eines Patienten mit maligner Erkrankung oder auch der Progression des Tumors korreliert werden. Dies zeigt den hohen Stellenwert und die Bedeutung der TMA-Analysen. Ihren Vorteil zieht die TMA-Technologie aus der effizienten Möglichkeit Gewebeschnitte parallel histopathologisch untersuchen zu können. Eine umfassendere und schnellere Analyse großer Patientenzahlen im Vergleich zur konventionellen Gewebeaufbereitung wird so ermöglicht.

Der Gebrauch von TMAs ist mittlerweile ein weltweit akzeptiertes Standardverfahren und bietet vor allem für die Tumorforschung verschiedene Anwendungsmöglichkeiten. Eine große Zahl fast identischer Gewebeslots kann so mit mehreren Antikörpern simultan untersucht werden [Merseburger et al. 2003]. Zusätzlich bietet das TMA-Verfahren die Möglichkeit einer Kombination mit anderen molekulargenetischen Verfahren (FISH, PCR, Immunhistochemie etc.). Für die TMA-Studie an mehr als 3800 Tumoren wurde die FISH verwendet (Abbildung 9). Um sich auf dem jeweiligen TMA besser orientieren zu können teilt man diesen in Blöcke ein. Ein Koordinatensystem ermöglicht dabei eine genaue Auswertung (Abbildung 10).

Für das Projekt wurden existierende TMAs verwendet, deren inhaltliche Darstellung später beschrieben wird. Bei dem für diese Studie verwendeten TMA handelt es sich um einen Prognose-TMA. Die Untersuchung ist hierbei retrospektiv. Der Prognose-TMA beinhaltet Tumorproben, von denen jeweils klinische Verlaufsdaten der Patienten (Follow-up-Daten) in einer Excel-Datei vorliegen. Diese Daten sind sehr wichtig für die Analyse signifikanter Zusammenhänge zwischen Genalterationen und klinischen Parametern.



**Abbildung 9 (A).** Vergrößerung eines TMA-Tumorspots in H.E.-Färbung und vergrößerte Darstellung nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung **(B).**



**Abbildung 10** (A) Darstellung eines TMA in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E) (Quelle modifiziert nach: Simon et al. 2002). (B) Die Organisation mit Hilfe eines Koordinatensystems dient der Orientierung und exakten Tumorzuordnung auf dem TMA.

### Herstellung eines Tissue-Microarray

Die Herstellung eines Tissue-Microarrays basiert auf vier grundlegenden Schritten. Diese bestehen aus der Gewebeauswahl, der Preparation eines Rezipientenblocks, der Herstellung eines TMA-Blocks sowie aus dem Zuschnitt des TMAs [Bubendorf 2001].

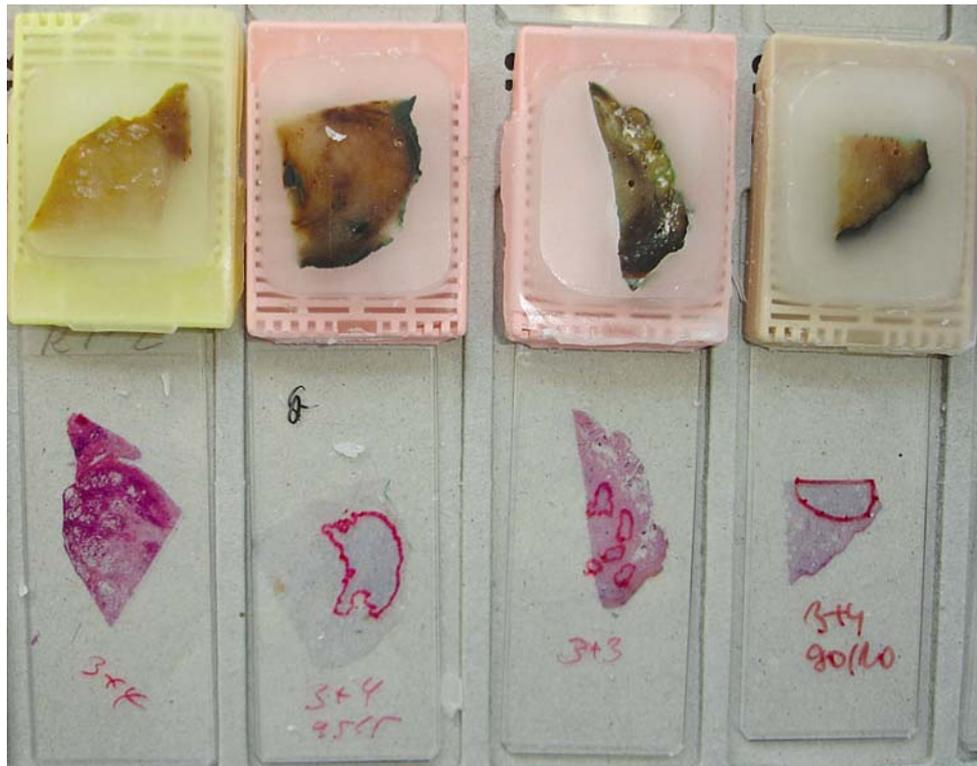
Zunächst werden alle für einen TMA benötigten Hämatoxylin-Eosin (H.E) gefärbten Gewebeschnitte aus den Archiven des pathologischen Archivs des Universitätsklinikums Eppendorfs (UKE) herausgesucht (Abbildung 11). Um repräsentative Tumorexemplare für den TMA zu erhalten, begutachtet ein Pathologe unter dem Lichtmikroskop die Schnitte auf ihre Eignung für die Microarray-Technik. Anschließend wählt er einen optimalen Gewebeschnitt mit großem Tumorareal aus. Die Tumorbereiche, die später gestanzt werden sollen, werden vom Pathologen mit einem farbigen Stift eingezeichnet. Diese markierten Schnitte

dienen im weiteren Vorgehen als Schablone zur Identifizierung der gewünschten Areale auf den Paraffinblöcken (Abbildung 12).

Anschließend werden die dazugehörigen Paraffinblöcke aus den Archiven herausgesucht und den jeweiligen H.E-Schnitten zugeordnet (Abbildungen 11 und 12). Nach Abgleich des betroffenen Tumorareals auf dem Paraffinblock werden die jeweiligen Bereiche ausgestanzt und in den Empfängerblock gesetzt.

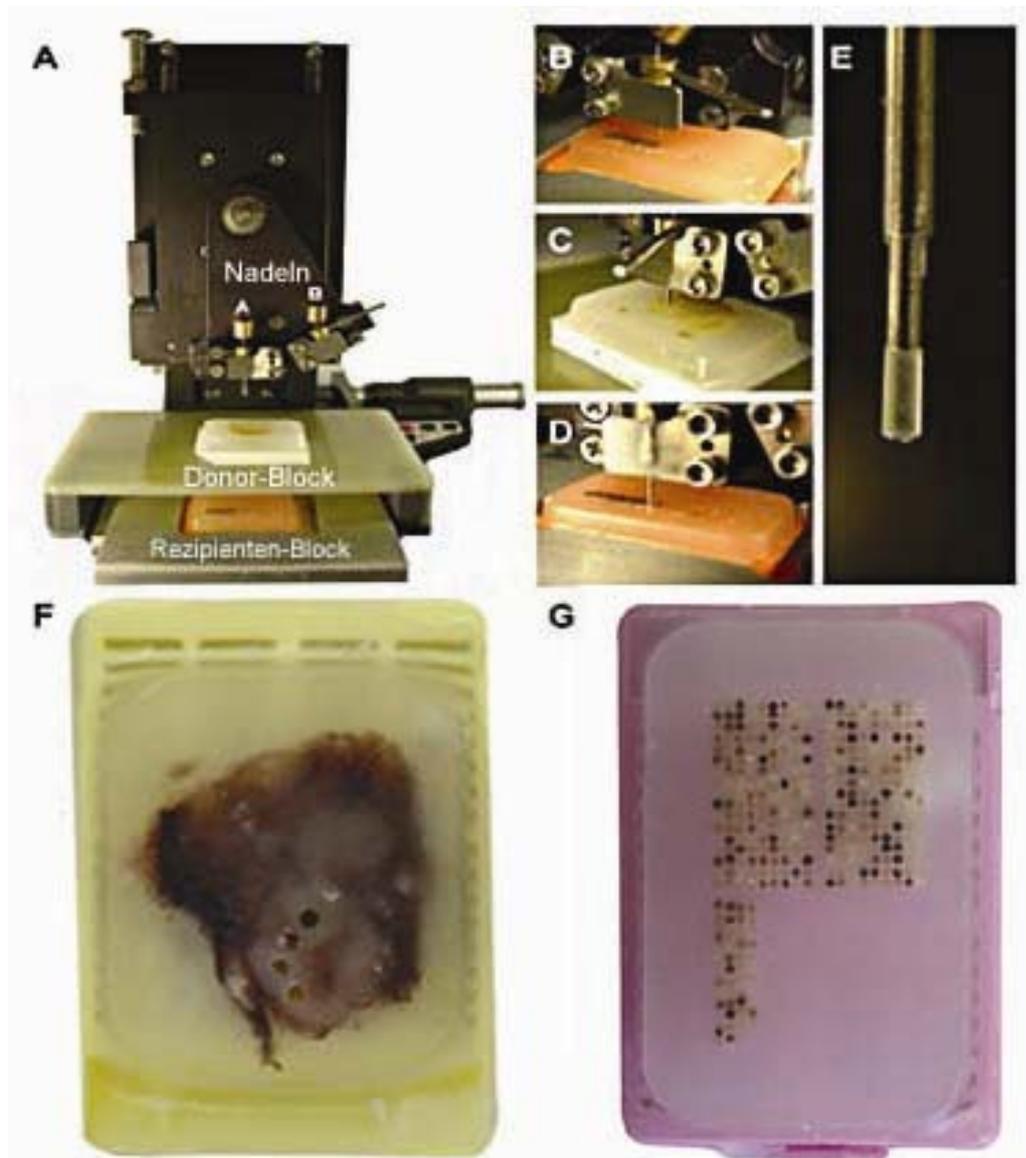


**Abbildung 11.** Archivraum des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Dargestellt sind die Archivschränke (**links**) und ein bereits geöffnetes Schubladensystem, in denen die Tumorschnitte nach Jahreszahl sortiert sind (**mittig**). Die jeweiligen Tumorböcke werden ebenfalls numerisch und nach Jahreszahl sortiert in Kartons aufbewahrt (**rechts**).



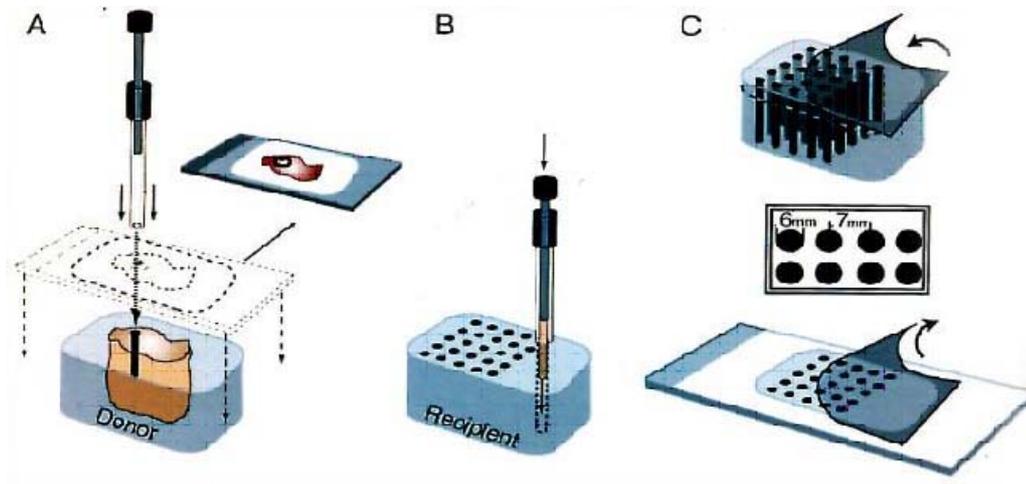
**Abbildung 12.** In Paraffin gebettete Tumorblöcke (obere Reihe) und die dazugehörigen Tumorschnitte (H.E. gefärbt) mit eingezeichnetem Tumorareal (untere Reihe, rot eingezeichnete Bereiche).

Kernstück der TMA-Herstellung ist das Array-Stanzgerät. Dieses besteht aus einem Hohlzylinder mit einem Innendurchmesser von 600  $\mu\text{m}$  (Abbildung 13).



**Abbildung 13** (A) Darstellung eines Array-Stanzgerätes mit den zwei Stanznadeln. (B-D) Darstellung der TMA-Herstellung, (E) Großaufnahme Stanznadel mit entnommenem Paraffinzylinder, (F) Tumorblock in Paraffin eingebettet (Donorblock). Zu sehen sind die bereits 0,6 mm großen Stanzlöcher, (G) fertig gestanzter TMA-Block (Rezipientenblock) (Quelle modifiziert nach: Simon et al. 2004).

Abbildung 14 veranschaulicht in den Punkten A bis C die wesentlichen Schritte der TMA-Herstellung.



**Abbildung 14.** Gewebe Microarray Technologie. (A) Gewebestück wird aus Donorblock gestanzt, (B) Einfügen des Gewebestücks in den Rezipientenblock, (C) Schneiden des Rezipientenblocks und Fixieren des Schnittes auf dem Objektträger (Quelle: Kononen et al. 1998).

Der Vorgang geht wie folgt von statten:

A) Zunächst entnimmt das Array-Stanzgerät einen Stanzzylinder vom jeweiligen Gewebeblock (Donor). B) Der Tumorzylinder wird in das vorgefertigte Loch des Rezipientenblocks gesetzt. C) Die Schritte A und B werden für jeden Tumor wiederholt. Am Ende erhält man einen Paraffinblock mit eingebetteten, unterschiedlichen Tumorspots. Auf diesem Weg können bis zu 1000 Tumorspots auf den Empfänger-Block übertragen werden.

Nach der Fertigstellung des TMA-Blocks wird dieser mit einem speziellen Schneidegerät (Mikrotom) zugeschnitten. Hierfür klebt man vor dem Zuschnitt ein Klebetape auf den TMA-Block. Anschließend wird ein circa 5µm dünner Schnitt gemacht, der an dem Tape haften bleibt. Der TMA-Schnitt wird danach auf einen speziellen Objektträger (Klebe-Slide) aufgebracht und zum Härten UV-Licht ausgesetzt. Danach kann das Klebetape vom Glas-Slide entfernt werden, sodass nur noch das Gewebe auf dem Objektträger haften bleibt. Der fertige TMA-Objektträger muss im Anschluss bei Raumtemperatur trocknen [Simon et al. 2005] und kann mit dem jeweils gewünschten Antikörper angefärbt werden.

## 2.2 Harnblasen-TMA

Für unsere Studie verwendeten wir einen bereits existierenden Harnblasen-TMA. Dieser besteht aus 768 Tumorexemplaren von 768 Patienten [Wild PJ et al. 2005]. Davon sind 576 Patienten männlichen Geschlechts und haben ein Durchschnittsalter von 68 Jahren (Altersbandbreite von 27 bis 100 Jahre). Follow-up-Daten sind von 510 männlichen Patienten vorhanden. Sie weisen ein mittleres Follow-up-Intervall von 40 Monaten auf (Bandbreite 1-120 Monate). Die verschiedenen Tumoren setzen sich aus 686 Urothelkarzinomen, 29 Plattenepithelkarzinomen, 19 kleinzelligen Karzinomen, 14 sarkomatoiden Karzinomen und 11 Adenokarzinomen zusammen. Das Tumor-Stadium und der Tumor-Grad wurden gemäß der *UICC*- (Union internationale contre le cancer) und *WHO* (World Health Organization) –Klassifikation von 1973 festgelegt [Mostofi et al. 1973].

Tumoren, bei denen man in der Biopsie eine Invasion des Stromas ohne erkennbare Beeinflussung der muskulären Harnblasenwand diagnostizieren konnte, wurden als pT1-Tumoren (pT1-) klassifiziert. Ein eindeutig papilläres Tumorwachstum lag vor, wenn papilläre Atypien auch in invasiven Tumorbereichen vorkamen. Ein Tumorrezidiv lag bei zystoskopisch sichtbarem Befund vor. Zeigten sich in der Tumorbiopsie Anzeichen einer Muskelinvasion, lag eine Tumor-Progression (Stadium pT2 oder höher) vor.

## 2.3 Prostata-TMA

Für die Untersuchung wurde ein bereits existierender Prostata-TMA verwendet [Schlomm et al. 2010]. Dieser besteht aus Tumoren, die bei radikalen Prostatektomien entnommen wurden. Hierbei handelt es sich um Tumoren von 3261 Patienten, die in der urologischen Fachabteilung des UKE in den Jahren 1992 bis 2004 behandelt wurden. Keiner der Patienten erhielt eine adjuvante Therapie. Ein Rezidiv der Erkrankung lag vor, wenn ein postoperativer Anstieg des PSA-Wertes auf 0,1 ng/ml und höher gefunden wurde.

Die Follow-up Daten lagen von 2385 Patienten vor und variierten zwischen 1 und 144 Monaten (Mittelwert 34 Monate). Die 3261 Tumorspots wurden auf sieben Microarray-Blöcke aufgeteilt. Jeder der TMA-Blöcke hat 129 bis 522 Tumorspots. Zusätzlich enthält jeder TMA verschiedene Kontroll-Gewebe, bestehend aus normalem Prostatagewebe, diversem Normalgewebe und einem Tumorset aus Kolon- und Mamma-Tumoren.

## **Prostatakarzinom-Gewebeschnitte**

Zusätzlich zum TMA wurde außerdem je ein Kontroll-Gewebeschnitt von 38 verschiedenen Prostatakarzinom-Patienten angefertigt, die in der urologischen Abteilung des UKE prostataktomiert wurden.

### **2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Für die Identifikation von Genveränderungen wurden in den letzten Jahren verschiedene Techniken und Methoden erforscht. Die Karyotypisierung gilt als Wegbereiter der chromosomalen Analyse und wurde Ende der 1950er Jahre entwickelt. Hierdurch erhält man die Möglichkeit numerische und auch strukturelle Chromosomenveränderungen beurteilen zu können. Anfang der 1970er Jahre kam eine weitere Neuerung hinzu, das „Chromosomen-Banding“. Durch diese Methode ist es möglich Metaphasechromosomen speziell anzufärben. Hierdurch werden die Chromosomenbänder als schwarz-weiße Muster angefärbt und erlauben so eine Abgrenzung der einzelnen Chromosomen. Chromosomale Veränderungen werden dadurch noch präziser beurteilt. Allerdings sind der klassischen Zytogenetik auch Grenzen gesetzt. Vor allem kleinste Chromosomenveränderungen können nicht beurteilt werden, da das „Chromosomen-Banding“ in seiner Auflösung limitiert ist.

Um dieser Problematik entgegenzuwirken wurde in den 1990er Jahren schließlich die FISH entwickelt, die die Sensitivität in der molekularen Zytogenetik entscheidend veränderte. Bei dieser Methode werden mittels fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden Chromosomen- oder Genabnormalitäten entdeckt. Eine einsträngige fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde lagert sich an komplementäre Zielsequenzen an. Mit dem Fluoreszenzmikroskop kann die Hybridisierung der Sonde visuell sichtbar gemacht werden.

Einen großen Vorteil gegenüber der konventionellen Zytogenetik zeigt die FISH-Methode durch eine höhere Sensitivität für Chromosomenveränderungen [Mark et al. 1998]. Selbst DNA-Abschnitte von wenigen 100 Kilobasenpaaren (Kbp) Länge lassen sich durch die FISH-Analyse untersuchen [Leitch et al. 1994]. Dadurch können auch zytogenetisch nicht erkennbare Deletionen oder Translokationen nachgewiesen werden. Die Grenzen der FISH-Methode zeigen sich jedoch bei sehr kurzen Sequenzen, die von Mutationen betroffen sind. Diese können mit der FISH-Methode nicht nachgewiesen werden.

Vor allem in der Tumordiagnostik (Philadelphia-Chromosom etc.) und auch in der postnatalen genetischen Diagnostik (Trisomie-Diagnostik etc.) wird dieses Verfahren angewendet. Die methodische Durchführung der FISH-Technik wird im folgenden Kapitel beschrieben.

## 2.5 FISH-Protokoll

Für die FISH-Analyse werden 3 µm dicke TMA-Schnitte verwendet. Vor der Hybridisierung müssen diese entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt werden. Zur Hybridisierung der Harnblasen- und Prostatakarzinom-Schnitte wird der *AneuVysion* DNA-Sonden-Kit (*CEP 18/X/Y-Sonde*) benutzt. Bei der verwendeten Sonde handelt es sich um eine Dreifarben-Sondenmischung, die aus den Spektren *Aqua*, *Green* und *Orange* besteht. Mit dieser Sonde werden die *D18Z1*-, *DXZ1* und *DYZ3*-Regionen der Chromosome 18, X und Y spezifisch angefärbt. Das Chromosom 18 wird in der FISH-Analyse im Aqua-Filter sichtbar, während sich Chromosom X im Grün-Filter darstellt. Das Y-Chromosom wird im Orange-Filter sichtbar und markiert den Zentromer-Bereich *Yp11.1* bis *Yq11.1*. Die Auswertung und Detektion der Signale wird mit einem Fluoreszenzmikroskop (Firma Zeiss, Axioplan) durchgeführt. Nachfolgend werden die Arbeitsschritte und das Laborprotokoll zur Durchführung der FISH beschrieben. Die Arbeitsschritte umfassen folgende Punkte:

- 1) Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Slides
- 2) Hybridisierung
- 3) Posthybridisierungs-Waschschritte
- 4) Detektion

**Materialien für die Arbeitsschritte 1-4:**

- Objektträgerwärmer (45 bis 50° Celsius)
- Deckgläschen verschiedener Größe (abhängig von der Größe des Präparats)
  - o 18 x 18 mm
  - o 24 x 32 mm
  - o 24 x 46 mm
- Mikroliter-Pipettor (1-10 µl, Eppendorf) und sterile Spitzen
- Stoppuhr
- Mikrozentrifuge (Eppendorf, UKE-Nr. 30800)
- Messzylinder
- Wasserbäder ( 72° +/-1° UKE-Nr. 46974 und 44183)
- pH-Meter (UKE-Nr. 20744)
- Pinzette
- Kalibrierte Thermometer
- Hybrite und Thermobrite (UKE-Nr. 74093 und 70247 und 73583)

## **Schritt 1 Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung**

Die TMA-Slides werden vor der Hybridisierung anhand des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis, Downers Grove, IL) vorbehandelt.

### **Verwendete Materialien**

- destilliertes Wasser
- Ethanol (70 %, 80 %, 96 %)
- Pretreatment Reagent
- Protease Buffer
- Xylol

### **Laborprotokoll: Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung**

- 1) TMA-Slides zur Vorbehandlung 3 x 10 min in Xylol-Bad tauchen
- 2) TMA-Slides 2 x 5 min in 96 % Ethanol entparaffinieren
- 3) TMA-Slides 3 min auf Heizplatte (48° Celsius) lufttrocknen
- 4) TMA-Slides 15 min in Pretreatment-Reagent bei 80° Celsius im Wasserbad enzymatisch vorbehandeln
- 5) TMA-Slides kurz in d H<sub>2</sub>O waschen
- 6) 45 min in Proteaselösung bei 37° Celsius andauen (kann auf 150 min bis max. 300 min verlängert werden)
- 7) TMA-Schnitte 2 min in 70 % Ethanol stellen
- 8) TMA-Schnitte 2 min in 80 % Ethanol stellen
- 9) TMA-Schnitte 2 min in 96 % Ethanol stellen
- 10) TMA-Schnitte 3 min auf Heizplatte (48° Celsius) lufttrocknen

## Schritt 2 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde für das Harnblasen- und Prostatakarzinom mit der konventionellen Aneuysion-Sonde durchgeführt. Die Sonde wird auf die TMA-Schnitte gegeben, für fünf Minuten bei 72° Celsius denaturiert und über Nacht bei 37° Celsius hybridisiert. Für die Denaturierung sowie die Hybridisierung wird der Thermobrite/Hybrite (Abott, Wiesbaden-Delkenheim) benutzt.

## Verwendete Materialien

- 10- 20 µl Sonde (richtet sich nach Größe des Arrays)
- Fixogum

## Laborprotokoll: Hybridisierung

- 1) 10-20 Mikroliter Sonde auf den TMA-Slide luftblasenfrei pipettieren
- 2) Deckgläschen auf Probe geben und blasenfrei verteilen
- 3) Deckgläschen mit Fixogum versiegeln
- 4) Bei 72° Celsius für 5 min denaturieren und über Nacht (14-18 h) bei 37° Celsius im Hybrite hybridisieren

### **Schritt 3 Waschen (2. Tag)**

Nach der Hybridisierung werden die TMA-Slides gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu lösen.

#### **Verwendete Materialien**

- 2 x SSC/0,3 % NP 40
- destilliertes Wasser
- NP 40
- DAPI I-Gegenfärbung (2 x 500µl) (Zusammensetzung: 1000 ng/mL DAPI I (4,6-Diamidino-2-phenylindol) in Phenylendiamin-Dihydrochlorid, Glycerin und Puffer

#### **Laborprotokoll: Waschen**

- 1) TMA-Slides von Fixogum entfernen und Deckgläschen entfernen
- 2) TMA-Slides in 2 x SSC/0,3 % NP40 pH 7,2-7,4 hineinstellen
- 3) TMA-Slides 2 min bei 72° Celsius im Waschpuffer (2 x SSC/0,3 % NP40) waschen
- 4) TMA-Slides kurz mit d H<sub>2</sub>O spülen und im Dunkeln lufttrocknen
- 5) Probe mit 10 µl (20 µl bei größeren Arrays) DAPI I gegenfärben und mit Deckgläschen versehen
- 6) TMA-Slides mit DAPI I lichtgeschützt behandeln

## **Schritt 4 Detektion**

### **Auswertung der TMA-Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop:**

Die Arbeiten im FISH Labor wurden mit Hilfe der Assistenzärzte Dr. P. Stahl, Dr. S. Minner, dem Medizinisch-Technischen Assistenten Herrn S. Eghtessadi und der Leiterin des FISH-Labors Frau S. Schnoeger durchgeführt.

Zur Detektion von Y-Verlusten wurden die einzelnen Spots mit dem Fluoreszenzmikroskop in der 63-er Vergrößerung untersucht. Dabei wurden Interphase-Zellkerne des Tumoreals gewählt, die sich möglichst wenig überlappen. Ausschließlich Spots mit eindeutigen Fluoreszenzsignalen wurden ausgewertet. Das CEP18-Signal (Aqua-Filter) diente bei der Auswertung als Referenzwert. Um zu vermeiden, dass Artefakte in die Auswertung aufgenommen werden, mussten die Signale für die Detektion der Y-Signale eindeutig und hell sichtbar sein. Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt der Hintergrund dar. Dieser sollte dunkel und frei von Trübungen oder fluoreszierenden Signalen sein.

### **Verwendete Materialien**

- Fluoreszenzmikroskop für die Auswertung: Firma Zeiss, Axioplan
- Fluoreszenzmikroskop zur Erstellung von digitalen FISH-Bildern:  
Firma Zeiss, Imager M.1 (Seriennr.: 3516000770)
- Filter (DAPI/AQUA/ORANGE/GRÜN)
- Immersionsöl

## 2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Untersuchungen am Harnblasen- und Prostatakarzinom erfolgte mit Hilfe des statistischen Programms *PRISM 2.01* (*GraphPad, San Diego, USA*). Das Signifikanzniveau ( $p$ ) der Analysen liegt bei 0,05.

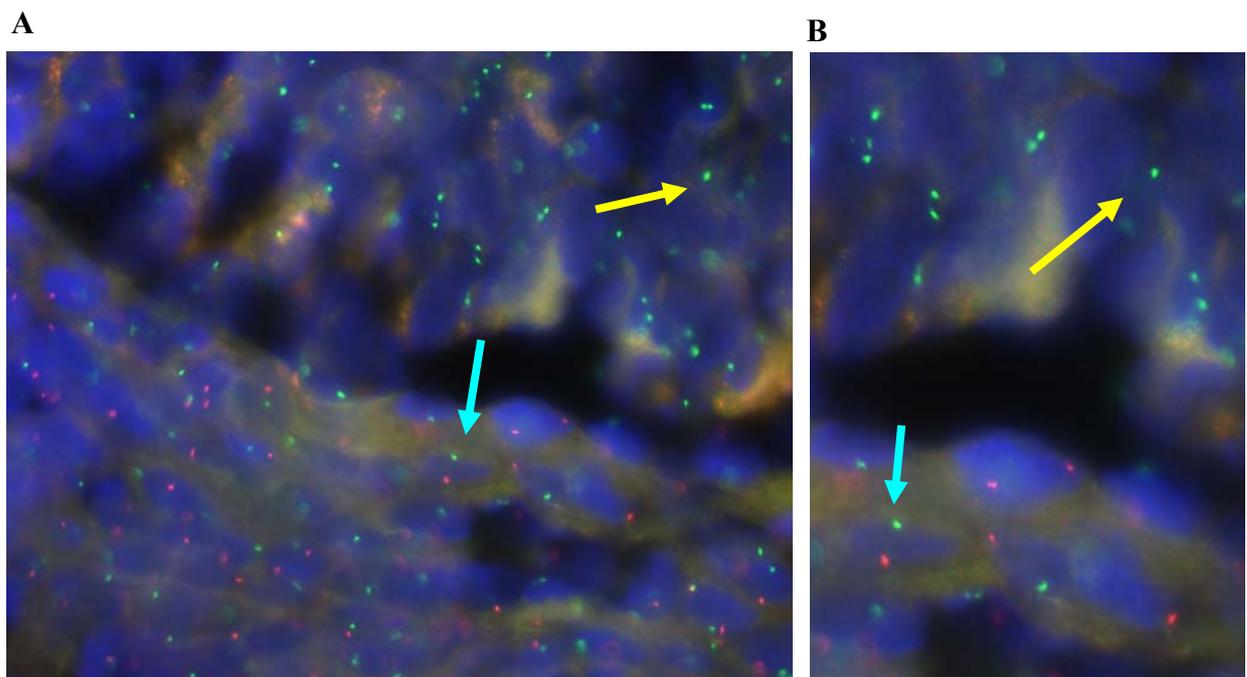
Die Analyse der Kontingenztabelle und Chi-Quadrat-Tests wurde durchgeführt, um einen Vergleich zwischen Y-Verlust und Grad, Stadium sowie Wachstum des Tumors anzustellen. Ein Vergleich der Überlebenskurven konnte mittels Kaplan-Meier-Methode berechnet und mit dem Logrank-Test verglichen werden.

Der Studienendpunkt der Analyse des Harnblasen- und Prostatakarzinoms wurde definiert als Zeitpunkt, bei dem die Patienten in ihrer letzten klinischen Kontrolluntersuchung noch keinen Hinweis auf eine rezidivierende Tumorerkrankung zeigten.

### 3 Resultate

#### 3.1 Harnblasen-TMA

In der FISH-Analyse konnten von 567 Harnblasentumoren männlicher Patienten 523 ausgewertet werden (92,2 %). 44 Tumoren waren nicht auswertbar. Dies ist zurückzuführen auf einen Verlust von Tumorgewebe, einen Verlust der Spots auf dem TMA oder eine schlechte Hybridisierung, die eine Auswertung unmöglich machte. Y-Verluste wurden bei 116 der 523 Harnblasentumoren beobachtet (22,2 %). Verluste des Y-Chromosoms konnten im gesamten Tumorareal beobachtet werden (Abbildung 15).



**Abbildung 15.** FISH am Beispiel eines Großflächenschnittes. **A)** Dargestellt sind Tumorzellen eines Harnblasenkarzinoms. **B)** Darstellung in Vergrößerung. Die verwendete Sonde markiert in jedem Zellkern das Y-Chromosom rot und das X-Chromosom grün (**blauer Pfeil**). Das Fehlen von roten Signalen in den Tumorzellen spricht für einen Verlust des Y-Chromosoms (**gelber Pfeil**).

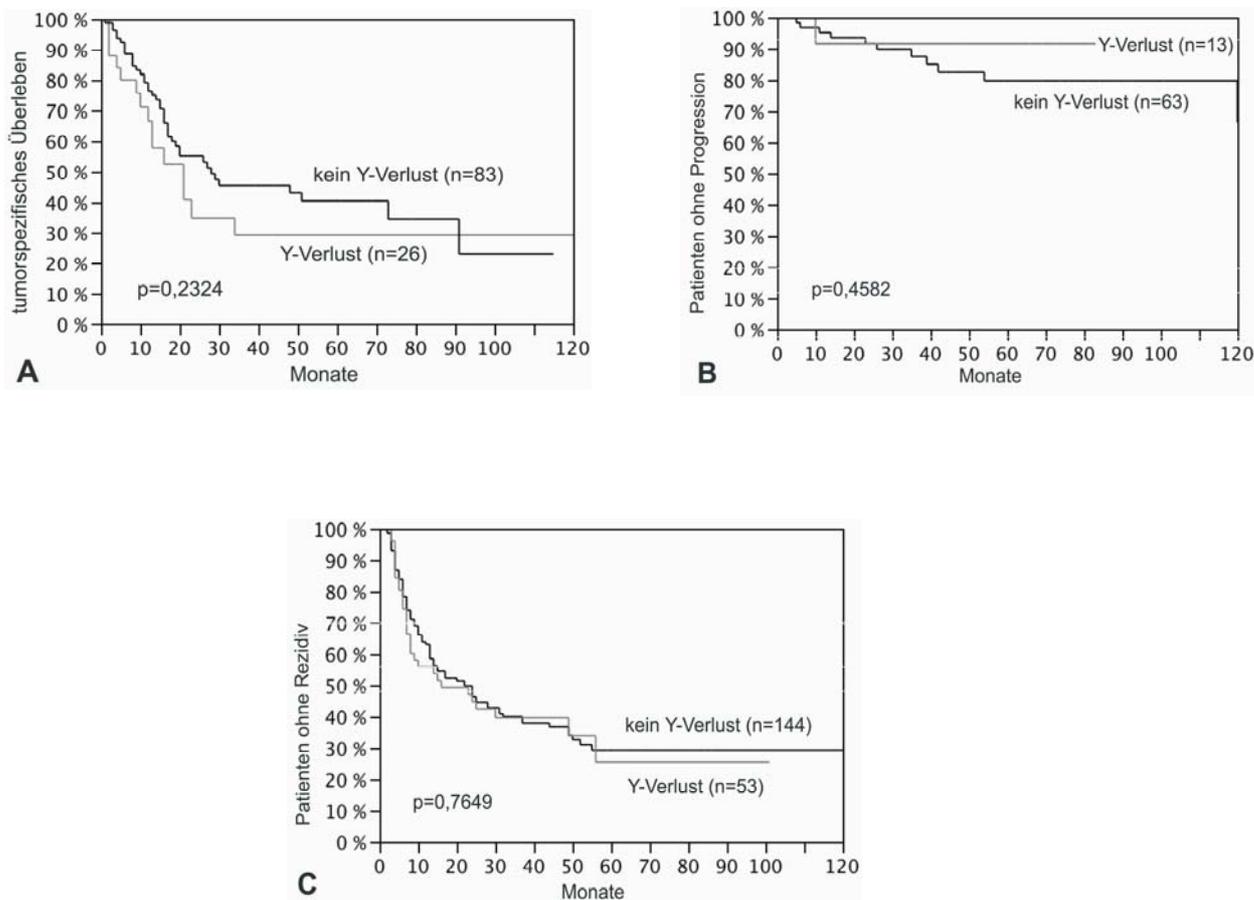
Die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen Patientenalter und dem Vorkommen von Y-Verlusten ergab keinen signifikanten Unterschied (Tumoren mit Y-Verlust: 67,4 +/- 4,3 Jahre vs. Tumoren ohne Y-Verlust: 67,3 +/- 2,3 Jahren). Der p-Wert von 0,9068 bestätigt dies. Zusätzlich konnte kein Zusammenhang zwischen Y-Verlust und Tumorphänotyp gezeigt werden (Tabelle 5). Hierbei wird deutlich, dass Y-Verluste bei Tumoren mit unterschiedlichem Grad ( $p=0,7831$ ) und Stadium ( $p=0,6140$ ) gleich häufig auftreten und dabei sogar unabhängig vom Tumorwachstumstyp sind (papilläres vs. solides Wachstum;  $p=0,7756$ ).

**Tabelle 5.** Zusammenhang zwischen Y-Verlust und Tumorphänotyp.

		n auf TMA	männliche Patienten (n)	männliche Patienten auswertbar (n)	Y-Verlust (n)	Y-Verlust (%)	p-Wert
alle Tumoren		768	567	523	116	22.2	
Histologie	Urothelkarzinom	686	516	477	110	23.1	0.4409
	Plattenepithelkarzinom	29	16	15	3	20.0	
	kleinzelliges Karzinom	19	13	12	1	8.3	
	sarkomatoides Karzinom	14	8	7	1	14.3	
	Adenokarzinom	11	6	6	1	16.7	
Stadium*	pTa	315	241	225	57	25.3	0.6140
	pT1	160	125	116	22	19.0	
	pT1-	4	4	4	1	25.0	
	pT2-4	207	146	132	30	22.7	
Grad*	G1	82	65	58	15	25.9	0.7831
	G2	300	225	212	50	23.6	
	G3	304	226	207	45	21.7	
Stadium und Grad*	pTa G1	82	65	58	15	25.9	0.8388
	pTa G2	185	141	134	35	26.1	
	pTa G3	48	35	33	7	21.2	
	pT1 G2	70	49	45	7	15.6	
	pT1 G3	94	80	75	16	21.3	
	pT2-4 G2	45	35	33	8	24.4	
	pT2-4 G3	162	111	99	22	22.2	
Wachstumsmuster*	papillär	540	414	387	90	23.3	0.7756
	solide	143	99	87	19	21.8	

\* nur Urothelkarzinome, \*\*alle Tumoren

Um die prognostische Rolle des Y-Verlustes zu ergründen, wurden klinisch-relevante Parameter im Harnblasenkarzinom untersucht. Hierbei wurde das tumorspezifische Überleben in den Subgruppen muskelinvasiver Tumoren der Stufe pT2-4, die Tumor-Progression bei pT1-Tumoren sowie das Wiederauftreten (Rezidive) von pTa-Tumoren analysiert. In die Untersuchung wurden ausschließlich Urothelkarzinome einbezogen. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Y-Verlusten und diesen untersuchten Parametern ergab die Analyse nicht (Abbildung 16 A-C).

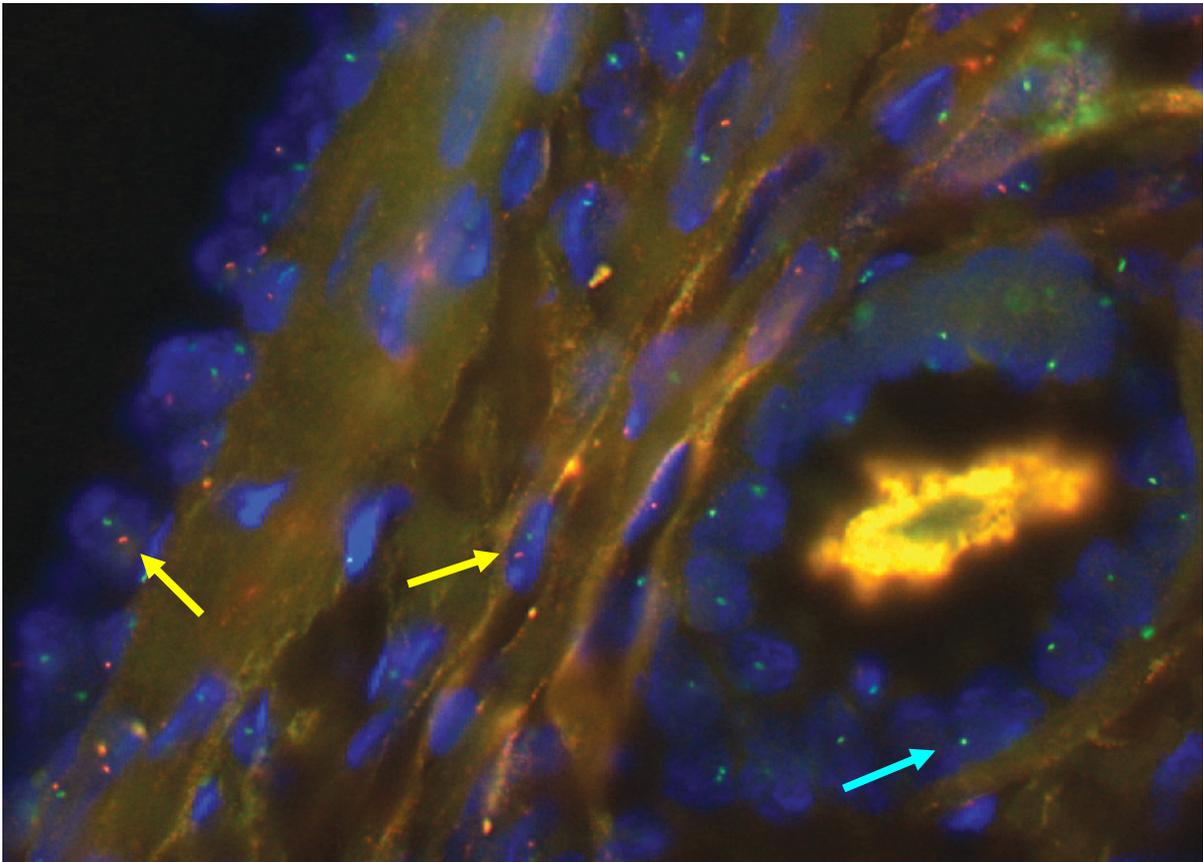


**Abbildung 16** (A) tumorspezifisches Überleben bei Urothelkarzinomen (pT2-4) mit und ohne Y-Verlust, (B) Tumor-Progression bei Patienten mit Y-Verlust und ohne Y-Verlust, (C) Wiederauftreten des Tumors bei Patienten mit Y-Chromosomenverlust und ohne Y-Verlust.

### 3.2 Prostata-TMA

Auf dem Prostata-TMA konnten von 3261 Prostatatumoren 2053 Spots ausgewertet werden (62,96 %). 1208 Tumoren waren nicht auswertbar (37 %), was auf schlechte Signale (142 Spots, 4 %), fehlende Gewebespots (280 Spots, 8,5 %) oder fehlendes Tumorgewebe (768 Spots, 2 %) zurückzuführen ist.

Von den 2053 auswertbaren Tumorspots zeigten in der FISH-Analyse lediglich 12 Tumoren eindeutige Y-Verluste im gesamten Tumorareal (0,6 %). Nur das umliegende Stromagewebe wies sowohl Signale für das X- als auch für das Y-Chromosom auf (Abbildung 17).



**Abbildung 17.** FISH am Beispiel eines Großflächenschnittes. Dargestellt sind Tumorzellen eines Prostatakarzinoms. Die verwendete Sonde markiert in jedem Zellkern das Y-Chromosom rot und das X-Chromosom grün (**blauer Pfeil**). Das Fehlen von roten Signalen in den Tumorzellen spricht für einen Verlust des Y-Chromosoms (**gelber Pfeil**).

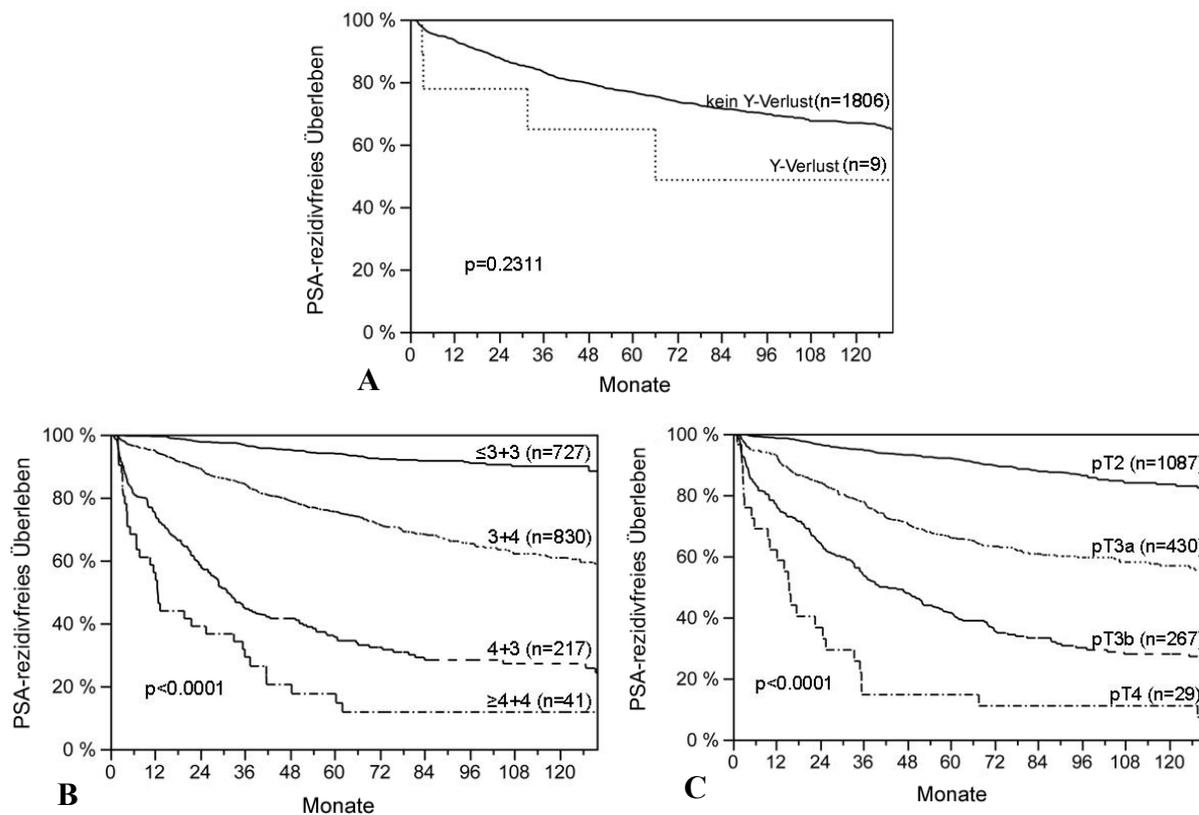
Es fand sich kein signifikanter Altersunterschied zwischen Tumoren mit Y-Verlust (62,8 Jahre +/- 3,8 Jahre) und Tumoren ohne Y-Verlust (62,2 Jahre +/- 6,1 Jahre). Unsere Analyse ergab keinen Zusammenhang zwischen Y-Verlusten und einem höheren Stadium (pT2-pT4) ( $p=0,8906$ ). Der Vergleich zwischen Y-Verlust und Gleason-Grad ergibt einen scheinbar signifikanten p-Wert von 0,0034. Ob dieser Befund Bedeutung bekommt ist auf Grund der Fallzahl schwierig zu sagen. Ein Zusammenhang zwischen Y-Verlust und einem erhöhten PSA-Wert konnte nicht hergestellt werden ( $p=0,6152$ ). Auch die Analyse zwischen Y-Verlust und positivem Absetzungsrand zeigt keinen Zusammenhang ( $p=0,3020$ ) (Tabelle 6).

**Tabelle 6.** Zusammenhang zwischen Y-Verlust und Tumor-Phänotyp, PSA-Level sowie positivem Absetzungsrand im Prostatakarzinom.

Parameter	n alle	n auswertbar	Y-Verlust (%)	p-Wert
alle Tumoren	3261	2053	12 (0.6)	
Gleason Score				
≤3+3	1426	800	3 (0.4)	0.0034
3+4	1311	880	1 (0.1)	
4+3	313	229	4 (1.8)	
≥4+4	55	46	2 (4.4)	
Tumor Stadium				
pT2	2080	1197	6 (0.5)	0.8906
pT3a	609	451	3 (0.7)	
pT3b	372	276	1 (0.4)	
pT4	42	29	0 (0.0)	
Präoperatives PSA (ng/ml)				
<4	1426	299	1 (0.3)	0.6152
4-10	1311	1010	4 (0.4)	
10-20	313	440	3 (0.7)	
>20	55	170	2 (1.2)	
Lymphknoten Status				
pN0	1544	1019	8 (0.8)	0.3084
pN+	96	68	0 (0.0)	
Absetzungsrand				
negativ	2475	1514	9 (0.59)	0.3020
positiv	627	438	1 (0.23)	

Die prognostische Rolle des Y-Verlustes wurde beim Prostatakarzinom anhand des PSA-rezidivfreien Überlebens untersucht. Wie eine Analyse der Gruppe mit und ohne Y-Verlust ergab, beeinflusst das Vorkommen eines Y-Verlustes die Wahrscheinlichkeit eines langfristig PSA-rezidivfreien Überlebens nicht signifikant ( $p=0,2311$ ) (Abbildung 18 A).

Auch das PSA-rezidivfreie Überleben nach einem Follow-up von fünf Jahren (60 Monate) lag bei Patienten mit niedrigem Gleason-Grad (<3+3) bei circa 94 %, während es für Patienten mit hohem Gleason (>4+4) bei ungefähr 20 % lag ( $p<0,0001$ ) (Abbildung 18 B). Diese Korrelation konnte auch für das Tumor-Stadium erhoben werden ( $p<0,0001$ ) (Abbildung 18 C).



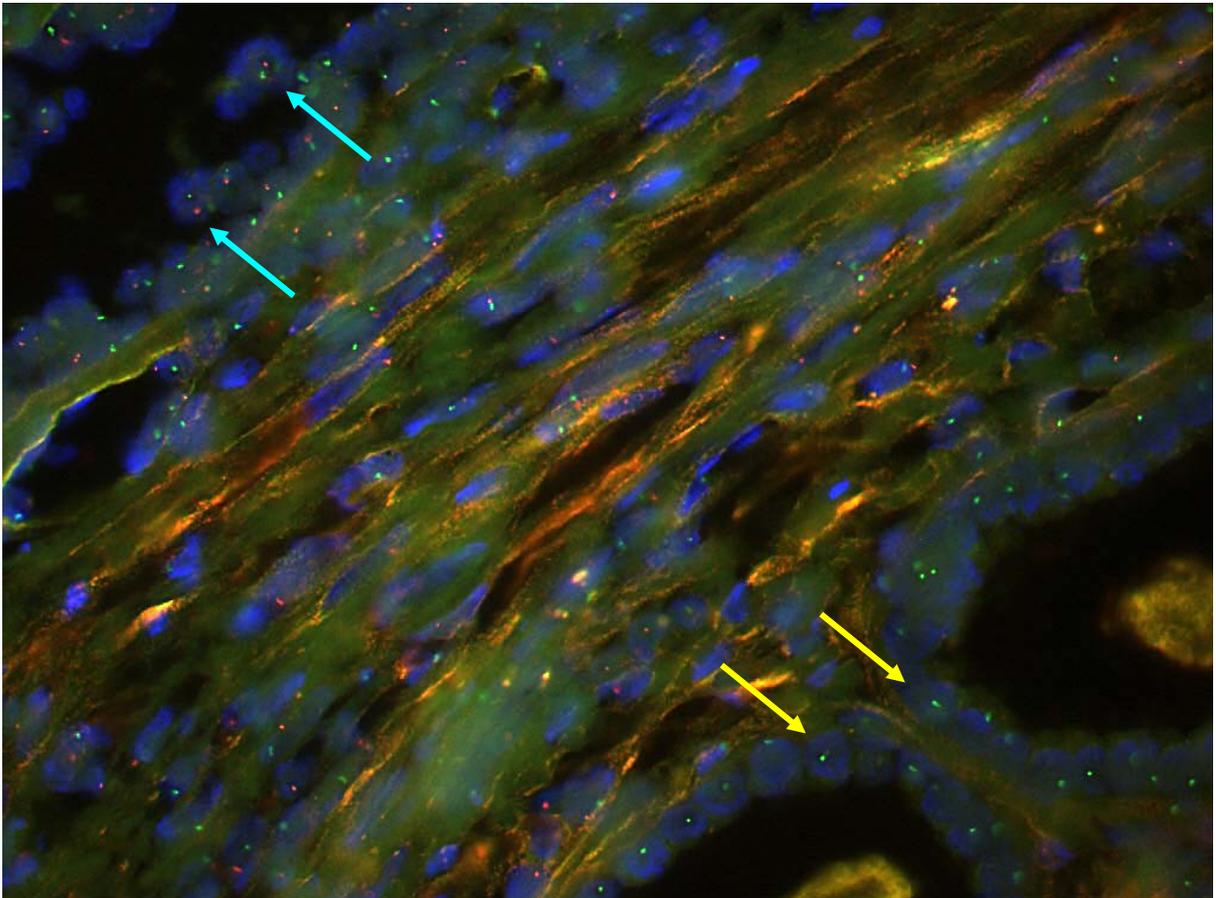
**Abbildung 18** (A) PSA-rezidivfreies Überleben und Y-Verlust, (B) PSA-rezidivfreies Überleben und Gleason-Grad, (C) PSA-rezidivfreies Überleben und Tumor-Stadium.

### Prostatakarzinom-Gewebeschnitte

Die FISH-Analyse der 38 Prostatakarzinom-Gewebeschnitte ergab zwei Fälle mit deutlichem Y-Verlust (Tabelle 7). Auf den beiden Gewebeschnitten zeigte sich ein heterogenes Bild aus Tumoren, die Y-Verluste zeigten und Tumoren, in denen noch Signale des Y-Chromosoms vorhanden waren (Abbildung 19).

**Tabelle 7.** Tabellarische Auflistung der 38 Patienten mit Prostatakarzinom.

Fall-Nr.	Stadium	Grad	pN	R	PSA ng/ml	Y- Verlust	kein Y- Verlust
1	pT2c	3+4	pN0	R0	k.A		X
2	pT2c	4+3	pN0	R0	4,3		X
3	pT2c	3+4	pN0	Rx	k.A		X
4	pT2c	4+5	pN0	R0	k.A		X
5	pT3b	5+4	pN1	R1	k.A		X
6	pT2c	3+4	pN0	R0	5,0		X
7	pT2c	3+4	pN0	R0	k.A		X
8	pT3a	4+3	pN0	R0	28,0		X
9	pT2c	3+3	pN0	R0	8,0		X
10	pT2c	4+3	pN0	R1			X
11	pT3a	4+3	pN0	R1	10,0		X
12	pT3a	3+4	pN0	R1	k.A		X
13	pT2c	3+4	pN0	R0			X
14	pT3b	4+3	pN0	R0	k.A		X
15	k.A	3+4	k.A	k.A	k.A		X
16	pT2c	3+3	pN0	R0	3,42		X
17	pT2c	4+3	pN0	Rx	k.A		X
18	pT3b	4+3	pN0	R0	k.A		X
19	pT2c	4+3	pN0	R1			X
20	pT3a	3+4	pN0	R1	k.A		X
21	pT3b	3+4	pN0	R0	6,1		X
22	pT2c	4+3	pN0	R0			X
23	pT2a	3+4	pN0	R0	k.A		X
24	pT2c	3+4	pN0	R0	4,9		X
25	pT2c	3+4	pN0	R0	k.A		X
26	pT2c	3+4	pN0	R0	20		X
27	pT2c	4+4	pN0	R0	k.A		X
28	pT2c	4+3	pN0	R1	4,0		X
29	pT3a	3+4	pN0	R0	7,92		X
30	pT2c	3+4	pN0	R0	k.A		X
31	pT2a	3+4	pN0	R0	4,3		X
32	pT2c	3+4	pN0	R0	k.A		X
33	pT2c	3+4	pN0	Rx	k.A		X
34	pT2c	4+3	pN0	R1	k.A		X
35	pT3a	3+4	pN0	R1	k.A	X	
36	pT2c	3+4	pN0	R0	k.A	X	
37	pT2c	3+4	pN0	R0	4,5		X
38	pT2c	4+3	pN0	R1	4,7		X



**Abbildung 19.** FISH an einem der 38 Prostatakarzinom-Gewebeschnitte. Es zeigt sich ein heterogenes Tumorbild. Tumorareal mit Y-Verlust (**unten rechts, gelber Pfeil**) und Tumorareal ohne Y-Verlust (**oben links, blauer Pfeil**).

## 4 Diskussion

### 4.1 Möglichkeiten des TMA-Verfahrens

Für die Erforschung molekularer Veränderungen stellt das TMA-Verfahren eine etablierte Methode dar. Unsere Untersuchung an mehr als 3800 Tumoren macht deutlich, dass Tissue-Microarrays als Forschungsinstrument hervorragend geeignet sind.

Die schnelle und effiziente Arbeit mit einem TMA zeichnet sich insgesamt als optimale Forschungsmethode gegenüber der Arbeit mit konventionellen Gewebeschnitten aus. In einer einzigen TMA-Analyse können beispielsweise 500 bis 1000 Gewebeproben auf einem Objektträger analysiert werden. Durch die erhöhte Analysegeschwindigkeit und Reduktion der verwendeten Reagenzien ermöglicht dieses Verfahren ein kosteneffektives Arbeiten. Die gewebesparende Verwendung der Tumorblöcke bei Herstellung eines TMA bietet einen weiteren Vorteil. Demnach können aus einem Tumor circa 300 Proben entnommen werden. Der daraus gewonnene TMA-Block bietet wiederum die Möglichkeit bis zu 300 Schnitte daraus anzufertigen, also insgesamt bis zu 90000 Analysen ( $300 \times 300$ ) aus nur einem Tumor durchzuführen. Ein weiterer Vorteil zeigt sich durch die Möglichkeit einer standardisierten Verarbeitung der TMA-Schnitte. Bei Verwendung eines TMA befinden sich typischerweise alle verwendeten Gewebeproben auf einem Objektträger. Jeder Spot weist demnach eine identische Schnittdicke auf und wird bei Verwendung der FISH identischen Parametern wie Inkubationsbedingungen, Temperatur und Konzentration der Reagenzien ausgesetzt. Nicht zuletzt das verwendete Laborprotokoll bietet dieses hohe Maß an Standardisierung, wodurch abweichende Ergebnisse im Labor und zwischen verschiedenen Laboren reduziert werden können.

Die TMA-Technik wurde im Jahr 1998 publiziert. Seitdem diskutieren viele Studien, inwieweit ein nur 0,6 mm großer Gewebespot ein relevantes Ergebnis repräsentieren könne. Die Skepsis liegt darin begründet, dass einzelne Tumorspots lediglich einen kleinen Ausschnitt des Ursprungstumors repräsentieren. Es wird befürchtet, dass vor allem fokal lokalisierte Genalterationen in heterogenen Tumoren unentdeckt bleiben könnten. Zahlreiche Studien setzten sich mit dieser Thematik auseinander und stellten einen Vergleich zwischen Resultaten aus TMA-Analysen und korrespondierenden Gewebeschnitten auf [Torhorst et al. 2001, Hoos et al. 2001, Sallinen et al. 2000, Camp et al. 2000, Mucci et al. 2000].

Hoos et al. [Hoos et al. 2001] beschrieben in einer immunhistochemischen Studie an 59 fibroblastischen Tumoren eine Übereinstimmung der Resultate von mehr als 90 % für p53, pRB und Ki67, wobei von jedem der 59 Tumoren jeweils 3 Spots vorlagen.

Eine Gruppe untersuchte in einer IHC-Analyse die Expression des Östrogen- und Progesteronrezeptors, sowie die p53-Expressionen an 553 Mamma-Karzinomen [Torhorst et al. 2001]. Verglichen mit konventionellen Gewebeschnitten reichte dabei ein einzelner Spot jedes Tumors aus um über 95 % der Resultate für den Östrogenrezeptor, 75-81 % für den Progesteronrezeptor und 70-74 % für das Tumorsuppressorgen p53 zu identifizieren.

In den Folgejahren der TMA-Entwicklung konnten zahlreiche Studien zeigen, dass bei Entnahme eines 0,6 mm großen Tumorspots sämtliche Zusammenhänge zwischen molekularen Parametern und klinisch-pathologische Merkmalen, die in der Literatur untersucht wurden, reproduziert werden konnten [Nocito et al. 2001, Moch et al. 1999].

Anhand von TMA-Studien am Nierenzellkarzinom wurde der bekannte Zusammenhang zwischen der Vimentin-Expression und einer schlechten Prognose nachgewiesen [Moch et al. 1999]. Eine Studie von Nocito et al. [Nocito et al. 2001] konnte an einem Harnblasen-TMA Zusammenhänge zwischen Differenzierungsgrad, Ki67-Labeling-Index, p53-Expression und dem klinischen Verlauf bzw. den Tumor-Stadien aufzeigen. Eine Tumor-Heterogenität grenzt die Möglichkeit, klinisch-pathologische Zusammenhänge mittels TMA zu erkennen, dabei nicht sonderlich ein. Grund hierfür ist eventuell die Tatsache, dass durch das TMA-Verfahren tausende Tumoren in die Studie einbezogen werden können.

## **4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Um Aberrationen und numerische Veränderungen von Chromosomen zu analysieren, stellt die FISH-Analyse eine wichtige molekurzytogenetische Arbeitsmethode dar [Stumm et al. 1999].

In Kombination mit der TMA-Analyse hat sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als hervorragende Methode etabliert und bietet die Möglichkeit Chromosomenaberrationen in Interphase- und Metaphasezellen zu entdecken. Hierbei können ganze Tumoren oder auch in Paraffin gebettete Tumorschnitte verwendet werden. Der Gebrauch von Zellkulturen ist hierbei nicht zwingend erforderlich [Micale et al. 1992, Persons et al. 1993].

Für diese Studie wurden DNA-Zentromersonden verwendet. Die Arbeit mit Zentromerproben ist eine etablierte Methode. Zentromerproben haben dabei den entscheidenden Vorteil, dass sie als helle und vor allem große Spots sichtbar werden. Die hohe Intensität der Zentromerproben ermöglicht es dabei zwischen Hintergrundfluoreszenzen zu unterscheiden, wodurch eine Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erleichtert wird [Wolman 1997, Poddighe et al. 1992].

### **4.3 Literaturübersicht zu Y-Verlusten im Harnblasenkarzinom**

#### **Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien**

In dieser TMA-Studie wurde das FISH-Verfahren verwendet, um das Vorkommen von Y-Verlusten in 523 Harnblasenkarzinomen zu untersuchen. Die Analyse ergab Y-Verluste in 22 %, woraus sich schließen lässt, dass diese Genalteration ein häufiges Phänomen darstellt. Die gleichmäßige Verteilung der Y-Verlustrate in allen Tumor-Graden und Stadien weist darauf hin, dass der Verlust des Y-Chromosoms eventuell an einen frühen Prozess der Tumorgenese geknüpft ist.

Ausschließlich zwei frühere Studien weichen von den von uns erzielten Ergebnissen deutlich ab. In einer zytogenetischen Analyse von Fadl-Elmula et al. [Fadl-Elmula et al. 2000] an Zellkulturen des Harnblasenkarzinoms wurden nur 10 % Y-Verluste entdeckt. Deutlich höhere Verlustraten (83 %) ergaben sich in einer FISH-Studie von Yu et al. [Yu et al. 2002].

Der Großteil der bereits publizierten Untersuchungen stimmt jedoch mit den Ergebnissen dieser Studie überein. Dort wurden Verluste des Y-Chromosoms zwischen 23 % und 44 % beschrieben [Panani und Roussos 2006, Sauter et al. 1995, Sauter et al. 1997, Sauter et al. 1998, Smeets et al. 1987, Neuhaus et al. 1999, Powell et al. 1990, Stamouli et al. 2004, Zhao et al. 1999, Khaled et al. 2000]. Festgehalten werden muss allerdings, dass die Stichprobengrößen der aufgeführten Studien sehr stark variieren (10 bis 125 Patienten), was einen Vergleich mit unserer Analyse insgesamt erschwert.

Die große Übereinstimmung der Resultate mit vergangenen Studien zeigt jedoch die Genauigkeit und Verlässlichkeit der verwendeten TMA-Technik auf. Hierdurch wurde eine einfache und schnell durchführbare Interpretation der FISH-Ergebnisse gewährleistet. Mehr als 500 Fälle konnten eindeutig ausgewertet werden. So zeigte sich in der FISH-Analyse

entweder ein vollständig erhaltenes Y-Signal oder ein Verlust der Signale in allen Tumorzellen. Die erzielten Ergebnisse sprechen insgesamt gegen eine klinische Bedeutung der Y-Verluste im Harnblasenkarzinom.

Die Analyse der 523 Harnblasenkarzinome männlicher Patienten ergab keinen Zusammenhang mit Parametern wie dem Phänotyp, Grad, Stadium, Patientenalter oder der Progression des Tumors. Die Y-Verluste waren in allen Graden und Stadien gleichmäßig vertreten. Wie Sauter et al. [Sauter et al. 1995] in ihrer FISH-Analyse bestätigten, weisen Harnblasenkarzinome in nicht-invasiven Tumoren bereits Y-Verluste auf. Sie vermuteten, dass Verluste des Y-Chromosoms zu einer genomischen Instabilität in diesen Tumoren führen können und als ein frühzeitiges Geschehen in der Tumorgenese anzusehen sind.

Während diese Analyse keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Patientenalter und dem Vorkommen von Y-Verlusten ergab (Tumoren mit Y-Verlust: 67,4 +/- 4,3 Jahre vs. Tumoren ohne Y-Verlust: 67,3 +/- 2,3 Jahren) (p-Wert: 0,9068), zeigten Sauter et al. [Sauter et al. 1995] deutlich höhere Y-Verluste bei Patienten über 80 Jahre (73 %) (im Vergleich: Patienten jünger als 71 Jahre: 26 % Y-Verluste).

Einen Zusammenhang zwischen Y-Verlusten und klinisch-pathologischen Parametern konnten auch andere Studien nicht bestätigen [Neuhaus et al. 1999, Sauter et al. 1997, Sauter et al. 1998, Yu et al. 2002]. Die eindeutige Rolle des Y-Chromosoms bleibt somit unklar. Erstaunlicherweise zeigte eine FISH-Studie von Neuhaus et al. [Neuhaus et al. 1999] sogar, dass 40 % der pT1-Tumoren ohne Y-Verlust eine Progression in ein muskelinvasives Karzinom zeigten, während keine der acht Tumoren mit Y-Verlust ein Progressionsverhalten aufwies (p=0,0387).

Von einer möglichen klinischen Bedeutung der Y-Verluste berichteten jedoch zwei Gruppen [Powell et al. 1990, Panani und Roussos 2006]. Während Panani und Roussos [Panani und Roussos 2006] einen Zusammenhang zwischen Y-Chromosomenverlust und Tumor-Grad vermuteten, zeigten Powell et al. [Powell et al. 1990] einen Zusammenhang mit der Tumorprogression. Powell et al. [Powell et al. 1990] spekulierten des Weiteren, dass sich auf dem Y-Chromosom ein sogenanntes „*Master-Anti-Onkogen*“ befindet, welches die Aktivität von Onkogenen durch seine Präsenz beziehungsweise seinen Einfluss unterdrückt.

In Bezug auf die Prognose des Harnblasentumors zeigten Stamouli et al. [Stamouli et al. 2004] in einer FISH-Analyse, dass die seltenen Adenokarzinome mit Y-Verlust eine schlechtere Prognose aufweisen, als Transitionalzellkarzinome.

#### 4.4 Literaturübersicht zu Y-Verlusten im Prostatakarzinom

##### Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien

Unsere Ergebnisse der Y-Verluste im Prostatakarzinom unterscheiden sich von früheren Studien und verdeutlichen, dass Y-Verluste mit einem Vorkommen von unter 1 % ein besonders seltenes Phänomen darstellen. Dies wird durch die Resultate unserer zusätzlich durchgeführten FISH-Analyse an 38 Prostatakarzinom-Gewebeschnitten gestützt. Nur zwei Tumoren wiesen einen kleinen Tumorbereich mit Y-Verlusten auf (5 %). Diese Daten stehen teilweise in Einklang mit früher durchgeführten Studien [Tricoli 1999, Takahashi et al. 1996, Baretton et al. 1994, Brothman et al. 1990].

Tricoli [Tricoli 1999] untersuchte an 42 Abklatschpräparaten des Prostatakarzinoms das Vorkommen von Y-Verlusten. In der FISH-Untersuchung verwendeten sie eine Sonde, die das gesamte Y-Chromosom anfärbt, wobei sie keinen Verlust in den untersuchten Fällen entdecken konnten. Eine zytogenetische Untersuchung am Prostatakarzinom ergab Y-Verluste in nur 5 % [Zitzelsberger et al. 2001]. Die anschließende FISH-Kontrolluntersuchung konnte von den 3 vermuteten Y-Verlusten nur einen Tumor mit Y-Verlust bestätigen. Eine ähnliche Studie unterstützt dies [Breitkreuz et al. 1993]. In einer nicht-isotopischen Hybridisierungsstudie (NISH) an 35 Prostatakarzinomen lag nur ein Fall mit Y-Verlust vor [Baretton et al. 1994]

Andere Studien beschrieben deutlich höhere Y-Verluste, deren Vorkommen zwischen 14 % und 53 % variierte [König et al. 1996, Alers et al. 2000, Celep et al. 2003]. Auch Haapala et al. [Haapala et al. 2001] beschrieben in einer CGH-Analyse des Prostatakarzinoms hohe Y-Verluste in 89 %.

Diese Untersuchung war darauf ausgerichtet einen möglichen Zusammenhang zwischen Y-Verlusten und einer prognostisch-klinischen Bedeutung für Patienten mit einem Harnblasen- bzw. Prostatakarzinom zu finden. Wir erstellten daher Kriterien, um Tumoren zu identifizieren, die eindeutige Y-Verluste aufweisen. Ausschließlich Tumoren, die in nahezu allen Zellen Y-Verluste zeigen, werden potentiell durch eine Inaktivierung bestimmter Y-chromosomaler Genabschnitte verursacht bzw. mitbedingt.

Y-Verluste liegen gemäß unserer Definition dann vor, wenn 50 % der ausgezählten Tumorzellen einen einheitlichen, sichtbaren Y-Verlust aufweisen. Wir verwendeten für die Auswertung demnach keinen errechneten Grenzwert. Das Kriterium ergab sich aus der Tatsache, dass wir bei den zwei Kontroll-Prostata-Gewebeschnitten mit Y-Verlust ein heterogenes Bild an Tumoren fanden. Hierbei zeigten sich Tumoreareale mit Y-Verlust sowie Tumorbereiche ohne Verlust des Y-Chromosoms. Die 50 %-Grenze soll dabei diesem „Mischbild“ gerecht werden. Ohnehin lag die Y-Verlustrate bei den ausgewerteten TMAs in allen Fällen weitaus über 50 %, sodass ein Tumor mit Y-Verlust deutlich als solcher zu erkennen war.

Bei Verwendung dieser Kriterien konnten wir auch in internen Studien an anderen Tumoren Y-Verluste entdecken. Diese Genalteration wurde im Harnblasenkarzinom (22,2 %), Nierenzellkarzinom (15,5 %), Ösophaguskarzinom (25,4 %), Lungenkarzinom (23,9 %), Kolonkarzinom (30,6 %), Pankreaskarzinom (11,6 %) und Hodenkarzinom (6,9 %) bereits nachgewiesen.

Einige in der Literatur beschriebenen Ergebnisse über Y-Verluste im Prostatakarzinom weichen teilweise stark von unseren Daten ab [König et al. 1994, König et al. 1996, Nadal et al. 2007]. Dies lässt sich durch eine von den Autoren unterschiedlich festgelegte Definition eines Y-Verlustes erklären. König et al. [König et al. 1994] legten für ihre Studie beispielsweise einen Grenzwert für Y-Verluste fest. Hierfür verglichen sie FISH-Ergebnisse miteinander, die an Prostatakarzinomgewebe und Normalgewebe erhoben wurden und legten sie als Referenzwerte fest. Je nach Studie wurden dabei 100 bis 300 nicht überlappende Zellkerne erfasst und die Signale für das Y-Chromosom gezählt. Danach wurde mit einer Standardabweichung von 2 bis 4 ein Referenzbereich für nicht veränderte Zellen festgelegt. Ein Y-Verlust lag vor, wenn die Proben aus dem definierten Bereich nach unten abwichen.

Zudem legten sie mit dem Grenzwert (Cut-off-Level) einen prozentualen Mindestwert fest, den ein Tumor mit Y-Verlust aufweisen muss um als Genalteration gewertet zu werden. Mit einem Grenzwert von 3,3 % konnten sie 53 % Y-Verluste im Prostatakarzinom entdecken. Ein Y-Verlust im Prostatakarzinom lag in ihrer Studie somit dann vor, wenn mindestens 3,3 % der ausgezählten Zellen eines Tumorexemplares Verluste des Y-Chromosoms zeigten (Cut-off-Level: 3,3 %). In einer weiteren Studie mit einem Cut-off-Level zwischen 5 % und 9 % wurden 14 % Y-Verluste im Prostatakarzinom entdeckt [König et al. 1996]. Nadal et al. [Nadal et al. 2007] konnten 53 % Y-Verluste im Prostatakarzinom finden, indem sie einen Grenzwert von 10 % festlegten.

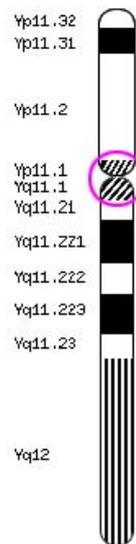
Ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die verwendete Methode sein. So wurden für viele Studien CGH-Analysen, Zelllinien oder PCR-Methoden (Polymerase-Ketten-Reaktion) verwendet. Die Ergebnisse dieser Studien variieren dabei.

Sandberg [Sandberg 1992b] gibt am Beispiel von Zelllinien-Analysen mutmaßliche Gründe dafür an. So diskutiert er die Möglichkeit, dass zytogenetische Veränderungen in Zelllinien nicht den Hauptkaryotyp eines Tumors repräsentieren. Vielmehr zieht er in Betracht, dass Genalterationen wie Y-Verluste bei Zelllinien vermutlich in-vitro generiert werden.

Zelllinien mit Y-Verlust sind laut Breikreuz et al. [Breikreuz et al. 1993] eine Art Sub-gruppe, die sich in Zellkulturen durch einen Proliferationsvorteil bemerkbar macht. In seiner zytogenetischen Zellkulturstudie an fünf Prostatakarzinomen zeigten alle Exemplare Y-Verluste auf. Nur einer dieser fünf Fälle mit Y-Verlust konnte jedoch in einer Interphase-FISH-Analyse bestätigt werden.

Andere Studien vermuteten ebenfalls, dass kultivierte Tumorzellen mit Y-Verlust einen Wachstumsvorteil haben könnten [Baretton et al. 1994, Tricoli 1999]. Eine Untersuchung von Kallioniemi und Visakorpi [Kallioniemi und Visakorpi 1996] zieht das Zellkulturverfahren an sich als mögliche Artefaktquelle in Betracht. Sie bestätigten, dass Y-Verluste auch in Zellkulturen normaler Zellen verloren gehen können.

Neben den in früheren Studien unterschiedlich verwendeten Methoden soll hier auch ein weiterer Aspekt diskutiert werden. Vor allem der Gebrauch von DNA-Sonden, welche verschiedene Abschnitte des Y-Chromosoms markieren, könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Die für unsere Untersuchung verwendete Y-Sonde markiert die Zentromer-Region des Y-Chromosoms im Bereich *Yp11.1* bis *Yq11.1* (Abbildung 20).



**Abbildung 20.** Das Y-Chromosom und seine Genloki. Die Aneuvysion-DNA-Sonde markiert die Region Yp11.1 bis Yq11.1 (**violetter Kreis**).

(Quelle: Cancer Genome Anatomy Project, [http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/BAC\\_Clone\\_Map?CHR=Y](http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/BAC_Clone_Map?CHR=Y), Stand: 31.01.2011, 16.19 Uhr).

Zusammenfassend unterscheidet sich demnach diese Analyse von anderen Studien durch **1)** die festgelegte Grenzwertdefinition bzw. das Cut-off-Level, **2)** die verwendete Methode, **3)** die verwendete DNA-Sonde und **4)** die Größe des Patientenkollektivs. Diese aufgeführten Unterschiede machen es schwierig die Ergebnisse untereinander zu vergleichen.

Nur zwei Studien verwendeten in ihrer Untersuchung an Tumorschnitten ebenfalls die FISH-Methode sowie zentromernahe Sonden [Celep et al. 2003, Baretton et al. 1994]. Die dort beschriebenen Y-Verlustraten variieren zwischen 2,8 % [Baretton et al. 1994] und 32 % [Celep et al. 2003].

Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass der Verlust des vollständigen Y-Chromosoms im humanen Prostatakarzinom selten vorkommt. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass kleine Genregionen oder sogar ganze Chromosomenarme beim Prostatakarzinom verloren gehen können [Tricoli 1999, Jordan et al. 2001]. Jordan et al. [Jordan et al. 2001] nehmen beispielsweise an, dass im Falle einer Deletion nicht das vollständige Y-Chromosom betroffen ist, sondern nur ein regionaler Y-Verlust vorkommt.

Um diese Hypothese zu bestätigen verwendeten sie in ihrer Studie Sonden, die die Yp-Region (*SRY*), die Yq-Region (*DYZ1*) sowie die Zentromerregion (*DYZ3*) des Y-Chromosoms markieren. Während sich im Bereich des kurzen und langen Armes (Yp und Yq) 58 % Deletionen zeigten, konnte kein Y-Verlust in der Zentromer-Region detektiert werden.

Auf Grundlage dieser Ergebnissen ließe sich schließen, dass Y-Verluste in zentromer-nahen Bereichen eher selten vorkommen. Wichtig ist insgesamt, dass die in den beiden Studien verwendeten Tumorexemplare ein weitaus kleineres Kollektiv ( $n < 40$ ) als das von uns verwendete aufwiesen ( $n = 3261$ ). Auch die übrigen Studien verfügten über deutlich kleinere Kollektivgrößen ( $n < 200$ ) was ihre Aussagekraft eher einschränkt.

Ein möglicher Grund für die hohen Y-Verluste in anderen Tumoren scheint ein spezieller Mechanismus genetischer Instabilität zu sein. Wir gehen davon aus, dass dieser Mechanismus beim Prostatakarzinom nicht existiert. Zudem besteht die Möglichkeit, dass einige Bereiche auf dem Y-Chromosom für das Wachstum und Überleben von Prostataepithelzellen notwendig sind.

#### **4.5 Y-Verluste im Normalgewebe - ein altersabhängiger Prozess?**

Die Rolle des Y-Chromosoms bei der Entstehung von malignen Erkrankungen bleibt weiterhin unklar und wird kontrovers diskutiert. Nicht zuletzt, weil Y-Verluste auch in normalen Geweben beschrieben wurden [Kovacs und Brusa 1989, Elfving et al. 1990].

In einer FISH-Studie an 35 Patienten konnten demnach 3 % Y-Verluste in normalen Urothelzellen gefunden werden [Betz et al. 1996]. Eine weitere FISH-Analyse führten Nadal et al. [Nadal et al. 2007] durch. Sie untersuchten das Vorkommen von Y-Verlusten in Tumorzellen und in Zellen nicht-maligner Samenblässchen von Patienten mit Prostatakarzinom. Sowohl in dem malignen als auch im normalen Gewebe kamen Y-Verluste sehr häufig vor. Interessanterweise war die Rate der Y-Verluste in den nicht-malignen Samenblasen sogar höher als die der Prostatakarzinom-Proben. Sie vermuteten, dass der hohe Prozentanteil von Y-Verlusten in nicht-malignen Samenblässchen eher als Indikator für den Altersprozesses anzusehen ist als dass er eine primäre zytogenetische Alteration in der Prostatakarzinogenese darstellt.

Auch Guttenbach et al. [Guttenbach et al. 1995] schlagen vor, dass Y-Verluste in nicht-neoplastischen Zellen auftauchen und mit dem Alter des Patienten assoziiert sind. In ihrer Analyse an Lymphozytenzellkernen von 138 Männern zeigten junge Patienten (15. Lebensjahr) Y-Verluste in 0,05 % der Fälle, während Patienten im hohen Alter (80. Lebensjahr) bereits 1,34 % Y-Verluste aufwiesen.

Eine weitere Gruppe (UKCCG) entdeckte beispielsweise Y-Verluste in neoplastischen und normalen Knochenmarkszellen [Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic bone marrows 1992]. Sie konnten einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Vorkommen von Y-Verlusten und einem höheren Patientenalter sowohl bei myeloproliferativen Krankheiten als auch in normalen Knochenmarkszellen zeigen. Daraus schließen sie, dass der Y-Verlust ein alterskorrelierter Faktor ist, messen dieser Genveränderung jedoch keine diagnostische Bedeutung zu. Andere Studien belegen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Y-Chromosomenverlust in Tumoren und dem Patientenalter. Herens et al. [Herens et al. 1999] zeigten in einer groß angelegten zytogenetischen Untersuchung (n=1907) an Knochenmarkszellen von leukämischen- und präleukämischen Patienten, dass Y-Verluste in diesen Zellen vielmehr mit dem Alter korrelieren, als dass sie mit einem neoplastischen Prozess in direkter Verbindung stehen.

Die Zahl der Prostatakarzinom-Fälle mit Y-Verlust ist zu niedrig, um einen bedeutsamen statistischen Schluss bezüglich eines Zusammenhanges mit dem Alter zu ziehen.

#### **4.6 Ausblick**

Das Harnblasenkarzinom ist dieser Studie zufolge nicht auf spezifische Gene des Y-Chromosoms angewiesen und kann bei Verlust wachsen. Das Prostatakarzinom scheint dagegen aufgrund seines geringen Y-Verlustes von 0,6 % von wichtigen Y-spezifischen Genen abhängig zu sein. Diese Vermutung könnte in einer zukünftigen Zellkulturstudie untersucht werden. Man müsste Zellkulturen von Prostatakarzinom- oder normalen Prostataepithelzellen züchten und den entsprechenden Genloкус auf dem Y-Chromosom ausschalten. Hierdurch ließe sich eventuell feststellen, ob eine maligne Transformation oder Progression der Zellen stattfindet.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Y-Verluste in Tumoren der Harnblase und Prostata zu finden um einen möglichen Zusammenhang mit diagnostisch-prognostischen Parametern zu identifizieren. In der Entwicklung eines Tumors spielen genetische Veränderungen, die die Funktion von Tumorsuppressorgenen ausschalten oder Onkogene aktivieren, eine entscheidende Rolle. Das Y-Chromosom weist eine Gruppe von Genen auf, die sich im Laufe der Evolution als Y-spezifisch formiert haben. Verluste des vollständigen Y-Chromosoms oder auch Teile dessen wurden in verschiedenen Tumoren gefunden. Zum Teil waren sie mit einem höheren Patientenalter, einem höheren Tumor-Grad, Tumor-Stadium oder einer schnelleren Progression assoziiert. Während ein großer Teil der Studien viele Jahre zurückliegt und ein nur kleines Patientenkollektiv aufwies, bestand ein für uns großes Interesse darin das Vorkommen der Y-Verluste an einem großen, aussagekräftigen Kollektiv urologischer Tumoren zu erforschen. In dieser Studie verwendeten wir einen Tissue-Microarray, um die Y-Verluste in Tumoren der Harnblase und Prostata zu untersuchen. Vor allem die TMA-Technik ermöglichte eine schnelle und präzise Auswertung und zeigte sich als potente Methode, um Genalterationen eines großen Tumorkollektivs in kürzester Zeit zu untersuchen.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich mich mit der FISH-Analyse von 567 Tumoren der Harnblase und 3261 Prostatakarzinomen beschäftigt.

Das Harnblasenkarzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung der ableitenden Harnwege und die siebthäufigste Krebserkrankung weltweit. Von den 523 auswertbaren Harnblasenkarzinomen (92,2 %) zeigten 116 Tumoren (22,2 %) Y-Verluste in allen Graden und Stadien. Dies spricht für ein frühes Geschehen in der Tumorentstehung. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Y-Verlusten und Tumor-Grad, Stadium, Progression oder Patientenalter besteht nicht.

Das Prostatakarzinom ist nach dem 70. Lebensjahr der häufigste aller bösartigen Tumoren des männlichen Geschlechts. Nach dem Lungenkarzinom stellt es die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern dar. In unserer Studie an 2053 auswertbaren Prostatakarzinomen (62,96 %) wiesen 12 Tumoren (0,6 %) Y-Verluste auf.

Wir vermuten, dass Y-Verluste im Prostatakarzinom eine seltene Genveränderung sind, die zudem nicht mit einem höheren Patientenalter korreliert, wie anfangs vermutet. Die Daten sprechen für ein mögliches Vorhandensein eines Y-Chromosom-Gens, das für die Vitalität von Prostataepithelien wichtig ist. Ein Zusammenhang zwischen Y-Verlusten im Prostatakarzinom und einer klinischen Relevanz wurde nicht gefunden.

Um die Ursache und Relevanz von Y-Verlusten in Tumoren weiter zu untersuchen, bzw. um herauszufinden welche Gene dafür verantwortlich sind, werden weitere Studien notwendig sein.

## 6 Literaturverzeichnis

**Alers JC**, Krijtenburg PJ, Vissers KJ, Bosman FT, van der Kwast TH, van Dekken H (1995) Interphase cytogenetics of prostatic adenocarcinoma and precursor lesions: analysis of 25 radical prostatectomies and 17 adjacent prostatic intraepithelial neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer*. 12(4):241-50.

**Alers JC**, Rochat J, Krijtenburg PJ, Hop WC, Kranse R, Rosenberg C, Tanke HJ, Schröder FH, van Dekken H (2000) Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest*. 80(6):931-42.

**Aly MS**, Dal Cin P, Moerman P, De Wever I, Devriendt K, Brock P, Casteels Van Daele M, Van Den Berghe H (1993) Loss of the Y-chromosome in a malignant Sertoli tumor. *Cancer Genet Cytogenet*. 65(2):104-6.

**Baretton GB**, Valina C, Vogt T, Schneiderbanger K, Diebold J, Löhns U (1994) Interphase cytogenetic analysis of prostatic carcinomas by use of nonisotopic in situ hybridization. *Cancer Res*. 54(16):4472-80.

**Betz J**, Meloni AM, Sandberg AA (1996) FISH studies on the Y chromosome in male urinary cells. *Cancer Genet Cytogenet*. 88(2):155-7.

**Bianchi NO** (2009) Y Chromosome structural and functional changes in human malignant diseases. *Mutat Res*. 682(1):21-7.

**Bottarelli L**, Azzoni C, Necchi F, Lagrasta C, Tamburini E, D'Adda T, Pizzi S, Sarli L, Rindi G, Bordi C (2007) Sex chromosome alterations associate with tumor progression in sporadic colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 13(15 Pt 1):4365-70.

**Bratt O**, Kristoffersson U, Lundgren R, Olsson H (1997) The risk of malignant tumours in first-degree relatives of men with early onset prostate cancer: a population-based cohort study. *Eur J Cancer*. 33(13):2237-40.

**Breitkreuz T**, Romanakis K, Lutz S, Seitz G, Bonkhoff H, Unteregger G, Zwergel T, Zang KD, Wullich B (1993) Genotypic characterization of prostatic carcinomas: a combined cytogenetic, flow cytometry, and in situ DNA hybridization study. *Cancer Res*. 53(17):4035-40.

**Brothman AR**, Peehl DM, Patel AM, McNeal JE (1990) Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res*. 50(12):3795-803.

**Brunelli M**, Eble JN, Zhang S, Martignoni G, Cheng L (2003) Gains of chromosomes 7,17, 12, 16, and 20 and loss of Y occur early in the evolution of papillary renal cell neoplasia: a fluorescent in situ hybridization study. *Mod. Pathol*. 16(10):1053-1059.

**Bubendorf L** (2001) High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *Eur Urol*. 40(2):231-8.

**Burch JD**, Rohan TE, Howe GR, Risch HA, Hill GB, Steele R, Miller AB (1989) Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer*. 44(4):622-8.

**Camp RL**, Charette LA, Rimm DL (2000) Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 80(12):1943-9.

**Celep F**, Karagüzel A, Ozgür GK, Yildiz K (2003) Detection of chromosomal aberrations in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Eur Urol*. 44(6):666-71.

**Center R**, Lukeis R, Vrazas V, Garson OM (1993) Y chromosome loss and rearrangement in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 55(3):390-3.

**Cussenot O**, Valeri A, Berthon P, Fournier G, Mangin P (1998) Hereditary prostate cancer and other genetic predispositions to prostate cancer. *Urol Int*. 60 Suppl 2:30-4; discussion 35.

**Dasari VK**, Goharderakhshan RZ, Perinchery G, Li LC, Tanaka Y, Alonzo J, Dahiya R (2001). Expression analysis of Y chromosome genes in human prostate cancer. *J Urol*. 165(4):1335-41.

**De Graaff WE**, van Echten J, van der Veen AY, Sleijfer DT, Timmer A, Schraffordt Koops H, de Jong B (1999) Loss of the Y-chromosome in the primary metastasis of a male sex cord stromal tumor: pathogenetic implications. *Cancer Genet Cytogenet*. 112(1):21-5.

**Delbridge ML**, Graves JA (1999) Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes. *Rev Reprod*. 4(2):101-9.

**Eble JN**, Sauter G, Epstein JI (2004) World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology&Genetics. In: Kleihues P, Sobin LH: Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, IARC Press, Lyon.

**Elfving P**, Cigudosa JC, Lundgren R, Limon J, Mandahl N, Kristoffersson U, Heim S, Mitelman F (1990) Trisomy 7, trisomy 10 and loss of the y chromosome in short-term cultures of normal kidney tissue. *Cytogenet Cell Genet*. 53(2-3):123-5.

**Ensembl Genome Browser**: [Online im Internet.] URL:

[http://Mar2010.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/Chromosome?r=Y:30242636-3034263](http://Mar2010.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=Y:30242636-3034263) [Stand: 12.03.2010, 17:25 Uhr].

**Fadl-Elmula I**, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S (2000) Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 29(3):256-65.

**Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI**. Krebs in Deutschland. Saarbrücken 2006.

**Glover FE Jr**, Coffey DS, Douglas LL, Russell H, Cadigan M, Tulloch T, Wedderburn K, Wan RL, Baker TD, Walsh PC (1998) Familial study of prostate cancer in Jamaica. *Urology* 52(3):441-3.

**Gnauck B** (Dissertation in progress). Heterogenität des Y-Chromosom-Verlustes in Seminomen des Hodens. Med. Dissertation Gnauck. Hamburg, Universitätsklinikum, Hamburg-Eppendorf.

**Graves JA, Schmidt MM** (1992). Mammalian sex chromosomes: design or accident? *Curr Opin Genet Dev.* 2(6):890-901.

**Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M** (1995) Sex Chromosome Loss and Aging: In Situ Hybridization Studies on Human Interphase Nuclei. *Am. J. Hum. Genet.* 57:1143-1150.

**Haapala K, Rökman A, Palmberg C, Hyytinen ER, Laurila M, Tammela TL, Koivisto PA** (2001) Chromosomal changes in locally recurrent, hormone-refractory prostate carcinomas by karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 131(1): 74-8.

**Hayes RB, Liff JM, Pottern LM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Schwartz AG, Swanson GM, Silverman DT, Brown LM, Hoover RN, et al.** (1995) Prostate cancer risk in U.S. blacks and whites with a family history of cancer. *Int J Cancer.* 60(3):361-4.

**Herens C, Brasseur E, Jamar M, Vierset L, Schoenen I, Koulischer L** (1999) Loss of the Y chromosome in bone marrow cells: results on 1907 consecutive cases of leukaemia and preleukaemia. *Clin Lab Haematol.* 21(1):17-20.

**Hicks RM, Walters CL, Elsebai I, Aasser AB, Merzabani ME, Gough TA** (1977) Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proc R Soc Med.* 70(6):413-7.

**Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C** (2001) Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol.* 158(4):1245-51.

**Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J** (2005) Molekular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol.* 58:673-684.

**Hunter S, Gramlich T, Abbott K, Varma V** (1993) Y chromosome loss in esophageal carcinoma: an in situ hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer.* 8(3):172-7.

**Janković S, Radosavljević V** (2007) Risk factors for bladder cancer. *Tumori.* 93(1):4-12.

**Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C** (1997) The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med.* 110(3):118-24.

**Johannsson M, Karauzum B, Dietrich C, Mandahl N, Hambræus G, Johansson L** (1995) Karyotypic abnormalities in adenocarcinomas of the lung. *Lung Cancer.* 12 (1):126-126(1), Elsevier.

**Jordan JJ**, Hanlon AL, Al-Saleem TI, Greenberg RE, Tricoli JV (2001) Loss of the short arm of the Y chromosome in human prostate carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 124(2): 122-6.

**Kallioniemi OP**, Visakorpi T (1996) Genetic basis and clonal evolution of human prostate cancer. *Adv Cancer Res.* 68:225-55.

**Khaled HM**, Aly MS, Magrath IT (2000) Loss of Y chromosome in bilharzial bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 117(1):32-6

**Klocker H**, Culig Z, Hobisch A, Cato AC, Bartsch G (1994) Androgen receptor alterations in prostatic carcinoma. *Prostate.* 25(5):266-73.

**König JJ**, Teubel W, van Dongen JW, Romijn JC, Hagemeyer A, Schröder FH (1994) Loss and gain of chromosomes 1, 18, and Y in prostate cancer. *Prostate.* 25(6):281-91.

**König JJ**, Teubel W, Romijn JC, Schröder FH, Hagemeyer A (1996) Gain and loss of chromosomes 1, 7, 8, 10, 18, and Y in 46 prostate cancers. *Hum Pathol.* 27(7):720-7.

**Kononen J**, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Med.* 4 (7):844-847.

**Kovacs G**, **Brusa P** (1989) Clonal chromosome aberrations in normal kidney tissue from patients with renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 37(2):289-90.

**Kowalski J**, Morsberger LA, Blackford A, Hawkins A, Yeo CJ, Hruban RH, Griffin CA (2007) Chromosomal abnormalities of adenocarcinoma of the pancreas: identifying early and late changes. *Cancer Genet Cytogenet.* 178(1):26-35.

(2010) Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin

**Kumar V**, Cotran R, Robbins T (2003) Robbins Basic Pathology. 7.Aufl. Saunders. 667-669.

**Lahn BT**, Pearson NM, Jegalian K (2001) The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nature Reviews Genet.* 2(3):207-16.

**Lau YF** (1999) Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene. *Am J Hum Genet.* 64(4):921-7.

**Lau YF**, **Zhang J** (2000) Expression analysis of thirty one Y chromosome genes in human prostate cancer. *Mol Carcinog.* 27(4):308-21.

**Leitch A**, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch I (1994) In Situ-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

**Li Z**, Haines CJ, Han Y (2008) Micro-deletions of the human Y chromosome and their relationship with male infertility." *J Genet Genomics*. 35(4):193-9.

**(1992)** Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic bone marrows. United Kingdom Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Genes Chromosomes Cancer* 5(1):83-8.

**Lucas SB** (1982) Squamous cell carcinoma of the bladder and schistosomiasis. *East Afr Med J*. 59(5):345-51.

**Mark HF**, Przygoda JJ, Sikov W (1998) Fluorescent in situ hybridization for identifying cytogenetic abnormalities in inadequate and suboptimal specimens. *Pathobiology*. 66(5):216-20.

**Meikle AW**, Smith JA, Stringham JD (1989) Estradiol and testosterone metabolism and production in men with prostatic cancer. *J Steroid Biochem*. 33(1):19-24.

**Merseburger AS**, Horstmann M, Hennenlotter J, Stenzl A, Kuczyk M (2003) Die Tissue-Microarray-Technik als neues „high throughput-tool“ für den Nachweis differentieller Proteinexpression. *J Urol Urogynaekol*. 10(3):5-8.

**Meschede D**, Horst J, Nieschlag E (1999) Störungen der sexuellen Differenzierung. In Diedrich, K. (Hrsg.) „Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe“, Urban & Schwarzenberg.

**Micale MA**, Mohamed A, Sakr W, Powell IJ, Wolman SR (1992) Cytogenetics of primary prostatic adenocarcinoma. Clonality and chromosome instability. *Cancer Genet Cytogenet*. 61(2):165-73.

**Missiaglia E**, Moore PS, Williamson J, Lemoine NR, Falconi M, Zamboni G, Scarpa A (2002) Sex chromosome anomalies in pancreatic endocrine tumors. *Int J Cancer*. 98(4): 532-8.

**Moch H**, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 154(4):981-6.

**Mostofi F**, Sobin L, Torloni H (1973) *Histological Typing of Urinary Bladder Tumors. International Classification of Tumors.*, 10 ed., World Health Organization, Geneva.

**Mucci NR**, Akdas G, Manely S, Rubin MA (2000) Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol*. 31(4):406-14.

**Nadal M**, Pera G, Pujadas J, Abril J, González L, Aguiló F, Condom E, Gómez-Zaera M, Nunes V (2007) Aneuploidy of chromosome Y in prostate tumors and seminal vesicles: a possible sign of aging rather than an indicator of carcinogenesis? *Mol Carcinog*. 46(7):543-552.

**Neuhaus M**, Wagner U, Schmid U, Ackermann D, Zellweger T, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G (1999) Polysomies but not Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. *Hum Pathol.* 30(1):81-6.

**Nocito A**, Bubendorf L, Tinner EM, Süess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Anabitar M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jäger P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G (2001) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol.* 194(3):349-57.

**Oosterlinck W**, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C (2006) Guidelines on bladder cancer. *Eur Urol.* 41(2):105-12.

**Panani AD, Roussos C** (2006) Sex chromosome abnormalities in bladder cancer: Y polysomies are linked to PT1-grade III transitional cell carcinoma. *Anticancer Res.* 26(1A):319-23.

**Perinchery G**, Sasaki M, Angan A, Kumar V, Carroll P, Dahiya R (2000) Deletion of Y-chromosome specific genes in human prostate cancer. *J Urol* 163(4):1339-42.

**Persons DL**, Gibney DJ, Katzmann JA, Lieber MM, Farrow GM, Jenkins RB (1993) Use of fluorescent in situ hybridization for deoxyribonucleic acid ploidy analysis of prostatic adenocarcinoma. *J Urol.*150(1):120-5.

**Poddighé PJ**, Ramaekers FC, Hopman AH. Interphase cytogenetics of tumours (1992) *J Pathol.*166(3):215-24.

**Poetsch M**, Kleist B, Lorenz G, Herrmann FH (1999) Different numerical chromosomal aberrations detected by FISH in oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 34(3):234-40.

**Powell I**, Tyrkus M, Kler E (1990) Apparent correlation of sex chromosome loss and disease course in urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 50(1):97-101.

**Pyakurel P**, Montag U, Castañón-Vélez E, Kaaya E, Christensson B, Tönnies H, Biberfeld P, Heiden T (2006) CGH of microdissected Kaposi's sarcoma lesions reveals recurrent loss of chromosome Y in early and additional chromosomal changes in late tumour stages. *AIDS* 20(14):1805-12.

**Rohde V**, Katalinic A, et al. (2007) Prostataerkrankungen, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 36. Robert Koch-Institut, Berlin. 7-21.

**Rübber H** (2007) Uroonkologie. 4. vollständig überarbeitete Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg. 418-519.

**Sallinen SL**, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Helén PT, Schraml P, Kallioniemi OP, Kononen J (2000) Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res.* 60(23):6617-22.

**Sandberg AA** (1992a) Chromosome changes in early bladder neoplasms. *J Cell Biochem Suppl.* 16I:76-9.

**Sandberg AA** (1992b) Chromosomal abnormalities and related events in prostate cancer. *Hum Pathol.* 23(4):368-80.

**Sauter G**, Moch H, Wagner U, Novotna H, Gasser TC, Mattarelli G, Mihatsch MJ, Waldman FM (1995) Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 82(2):163-9.

**Sauter G**, Gasser TC, Moch H, Richter J, Jiang F, Albrecht R, Novotny H, Wagner U, Bubendorf L, Mihatsch MJ (1997) DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol Res.* 25 Suppl 1:S37-43.

**Sauter G**, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC (1998) Molecular cytogenetics of bladder cancer progression. *Eur Urol.* 33 Suppl 4:9-10.

**Schaid DJ**, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN (1998) Evidence for autosomal dominant inheritance of Prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 62(6):1425-38.

**Schlomm T**, Chun FKh, Erbersdobler A (2010) From gene to clinic: TMA-based clinical validation of molecular markers in prostate cancer. *Methods Mol Biol.* 664:177-8.

**Schnieders F**, Dörk T, Arnemann J, Vogel T, Werner M, Schmidtke J (1996) Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum Mol Genet.* 5(11):1801-7.

**Sengupta N**, Siddiqui E, Mumtaz FH (2004) Cancers of the bladder. *J R Soc Health.* 124(5):228-229.

**Sharma S**, Ksheersagar P, Sharma P (2009) Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am Fam Physician.* 80(7):717-23.

**Simon R, Sauter G** (2002) Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol.* 30(12):1365-72.

**Simon R**, Mirlacher M, Sauter G (2004) Tissue microarrays. *BioTechniques.* 36(1):98-105.

**Simon R**, Mirlacher M, Sauter G (2005) Tissue microarrays. *Methods Mol Med.* 114:257-68.

**Skaletsky H**, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfling T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 423(6942):825-37.

**Smeets W**, Pauwels R, Laarakkers L, Debruyne F, Geraedts J (1987) Chromosomal analysis of bladder cancer. III. Nonrandom alterations. *Cancer Genet Cytogenet.* 29(1):29-41.

**Sökeland**, Schulze, Rübben (2002) *Urologie*. 12. Aufl. Thieme Verlag. Stuttgart.

**Sperling H**, Rossi R, Lümnen G, Rübben H (2004) Testosteron und Prostata. *Urologe A.* 43:1092-1096.

**Stamouli MI**, Panani AD, Ferti AD, Petraki C, Oliver RT, Raptis SA, Young BD (2004) Detection of genetic alterations in primary bladder carcinoma with dual-color and multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet and Cytogenet.* 149(2):107-13.

**Stein JP**, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG (2001) Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol.* 19(3):666-75.

**Steinberg GD**, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC (1990) Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 17(4):337-47.

**Stumm M**, Tönnies H, Wieacker PF (1999) Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood diseases. *Eur J Pediatr.* 158(7):531-6.

**Takahashi S**, Alcaraz A, Brown JA, Borell TJ, Herath JF, Bergstralh EJ, Lieber MM, Jenkins RB (1996) Aneusomies of chromosomes 8 and Y detected by fluorescence in situ hybridization are prognostic markers for pathological stage C (pt3N0M0) prostate carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2(1):137-45.

**Torhorst J**, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol.* 159(6):2249-56.

**Tricoli JV** (1999) Y chromosome enumeration in touch preparations from 42 prostate tumors by interphase fluorescence in situ hybridization analysis. *Cancer Genet Cytogenet.* 111(1):1-6.

**UICC** (1992) *Classification of Malignant Tumors*. 4.ed, Springer. Berlin.

**Van Dekken H**, Alers JC, Riegman PH, Rosenberg C, Tilanus HW, Vissers K (2001) Molecular cytogenetic evaluation of gastric cardia adenocarcinoma and precursor lesions. *Am J Pathol.* 158(6):1961-7.

**Vijayakumar S**, Hall DC, Reveles XT, Troyer DA, Thompson IM, Garcia D, Xiang R, Leach RJ, Johnson-Pais TL, Naylor S (2006) Detection of recurrent copy number loss at Yp11.2 involving TSPY gene cluster in prostate cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 66(8):4055-64.

**Vogelstein B, Kinzler KW** (1998) *The genetic basis of human cancer*. Mc Graw-Hill, 173. New York.

**Wang MC**, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979) Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol.* 17(2):159-63.

**Wetterauer U**, Rutishauser G, Sommerkamp H (1995) *Urologie*. Walter de Gruyter Verlag, New York.

**Whittemore AS**, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, West DW, Teh CZ, Stamey T (1995) Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol.* 141(8):732-40.

**Wild PJ**, Kunz-Schughart LA, Stoehr R, Burger M, Blaszyk H, Simon R, Gasser T, Mihatsch M, Sauter G, Hartmann A (2005) High-throughput tissue microarray analysis of COX2 expression in urinary bladder cancer. *Int J Oncol.* 27(2):385-391.

**Wolman SR** (1997) Applications of fluorescence in situ hybridization techniques in cytopathology. *Cancer.* 81(4):193-7.

**Yu DS**, Chen HI, Chang SY (2002) Chromosomal aberrations in transitional cell carcinoma: ist correlation with tumor behaviour. *Urol Int.* 69(2):129-35.

**Zhao J**, Richter J, Wagner U, Roth B, Schraml P, Zellweger T, Ackermann D, Schmid U, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G (1999) Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa). *Cancer Research.* 59(18):4658-61.

**Zitzelsberger H**, Engert D, Walch A, Kulka U, Aubele M, Höfler H, Bauchinger M, Werner M (2001) Chromosomal changes during development and progression of prostate adenocarcinomas. *Br J Cancer.* 84(2): 202-8.

## 7 Danksagung

Ich möchte mich bei all denjenigen herzlich bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre:

Ein besonders großes Lob und Dankeschön möchte ich meinem Doktorvater

**Prof. Dr. med. G. Sauter** aussprechen, der es mir ermöglicht hat, diese Dissertation zu schreiben. Durch seine Unterstützung und Hilfe konnte ich die Arbeit im Zeitrahmen durchführen.

Für die großartige Betreuung danke ich ebenfalls Herrn **Dr. med. P. Stahl**. Der ständige Kontakt und die Unterstützung bei der Durchführung haben mir sehr geholfen. Auch Frau **Dr. med. S. Minner**, danke ich für die hervorragende Hilfe bei der Durchführung der Harnblasen-Thematik und für die Beurteilung von Tumoren. Weiterhin danke ich Herrn **Dr. R. Simon** und Herrn **Dr. rer. nat. P. Tennstedt**, die mich bei der statistischen Auswertung der Daten unterstützten.

Ich möchte mich außerdem bei Frau **C. Koop** für ihren tollen Einsatz und ihr Organisationstalent bedanken. Ich habe die Zusammenarbeit sehr genossen und geschätzt. Danke, dass du dich so toll um uns Doktoranden/-innen gekümmert hast!

Ein großes Lob möchte ich auch an das Team im FISH-Labor richten. Allen voran Frau **S. Schnöger** und Herrn **S. Eghtessadi** ohne deren Engagement, Unterstützung und gute Laune im Labor diese Dissertation niemals hätte durchgeführt werden können.

Ich möchte auch meine Freunde erwähnen, die für mich da waren.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mich zu jeder Zeit gestützt, ermutigt und beraten hat. Diese Dissertation widme ich euch.

## **8 Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## **9 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....

Hamburg, 12. November 2012

