



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Patogenes för prostatacarcinom hos hund

En jämförelse med människan

Alexandra Leijon



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010:19

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2010



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Patogenes för prostatacancer hos hund - en jämförelse med människan

Pathogenesis of canine prostatic carcinoma
A comparison with man

Alexandra Leijon

Handledare:

Fredrik Södersten, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Désirée S. Jansson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: VM0068

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2010

Omslagsbild: Alexandra Leijon

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010:19
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: hund, patogenes, prostata, cancer, carcinom, människa, onkogen, suppressorgen, androgen, prostaglandin

Key words: dog, pathogenesis, prostate, cancer, carcinoma, human, oncogene, suppressor gene, androgen, prostaglandin

Innehållsförteckning

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING.....	3
Problemställning avseende neoplasier i prostata hos hund	3
Syfte med uppsatsen.....	3
Anatomi, histologi och fysiologi för prostata	3
MATERIAL OCH METODER.....	4
LITTERATURÖVERSIKT	4
Immunsystemet.....	4
Androgenreceptorns betydelse.....	5
Betydelsen av prostaglandiner.....	6
Suppressorgener	7
Onkogener	10
DISKUSSION	11
LITTERATURFÖRTECKNING.....	17

SAMMANFATTNING

Prostatakörteln producerar ett sekret som utgör en del av sädesvätskan. Prostata hos hund är histologiskt uppbyggd av acinärt körtelepitel som avslutas med gångstrukturer in mot urinrörets perifera delar. Detta körtelepitel kan tumörvandlas, varvid prostatacarcinom (PC) uppstår. Denna uppsats avser göra en litterär sammanställning av patogenesen för PC hos hund utifrån ett komparativt perspektiv. Frågeställningen besvaras genom litteratursökningar i databaserna PubMed och Web of Knowledge.

Resultaten visar att immunsystemet spelar stor roll vid utvecklingen av PC. Tumörvävnad känns igen av kroppens immunförsvar via TAA (Tumor Associated Antigens). Androgenreceptorn (AR) nedregleras och uttrycks cytoplasmiskt snarare än nukleärt vid PC. Tumören kan inducera enzymet COX-2, ett enzym som även uppträder vid inflammatoriska processer. I uppsatsen diskuteras också onkogener och suppressorgener som har trolig betydelse vid PC hos människa och hund.

Sammanfattningsvis är carcinogenesen för PC hos hund komplicerad, och trots att inte samtliga data är direktöversättliga från human forskning så kan många lärdomar dras därav. Dock behövs mer djurslagsspecifik forskning för att styrka nuvarande resultat, såväl på humansidan som veterinärsidan.

SUMMARY

The prostate gland produces a secretion which constitutes a part of the seminal fluid. Histologically, the canine prostate consists of acinar epithelium, ending in ductules in the periuretral area. The epithelium of the prostate could potentially transform into cancerous tissue, in which case prostatic carcinoma (PC) is the outcome. This paper aims to give a literature-based summary of the pathogenesis for canine PC from a comparative point of view. In order to achieve this, the databases PubMed and Web of Knowledge were used to search for articles.

The results show that the immune system is important for the pathogenesis of PC. Tumors are recognized by the immune system from their expression of TAA's (Tumor Associated Antigens). The androgen receptor (AR) is down-regulated and expressed mainly in the cytoplasm rather than in the nucleus in PC. PC can induce COX-2, an enzyme which can also be detected in inflammatory processes. Moreover, the discussion in this paper will be focused on oncogenes and suppressor genes which have implications for human and canine PC.

In conclusion, the pathogenesis of PC is intricate. Although not all human research is directly applicable to canine PC, many lessons can be learned from it. However, more species-specific research has to be conducted to strengthen current results.

INLEDNING

Problemställning avseende neoplasier i prostata hos hund

Incidensen av prostatacarcinom (PC) hos hund är låg i ett populationsperspektiv (0,2-0,6 % enligt Lai et al., 2008 a). Dock är hunden unik bland våra husdjur i avseendet att den spontant utvecklar detta tillstånd, och då i samband med hög ålder. Med anledning av detta har hunden fått tjäna som modelldjur för människan i onkologiska studier. Därför är det viktigt att kartlägga patogenesen för detta tillstånd hos hund utifrån ett komparativt perspektiv, vilket gagnar såväl hund som människa vid utvärdering av framtida behandlingsalternativ.

Syfte med uppsatsen

Syftet är att ge en litteraturbaserad sammanställning av de mekanismer som är relevanta för uppkomst av carcinom i prostata. I detta ingår jämförelser med den humana patogenesen, och en diskussion kring skillnader och likheter.

Anatomi, histologi och fysiologi för prostata

Prostata är en accessorisk könskörtel som hos hund är lokaliserad dorsokaudalt om urinblåsans hals (*cervix corpus vesicae*). Den vilar på det område av urinröret som finns inuti bäckenhålan (*uretra masculina pars pelvina*) och tömmer sig i öppningar luminalt i urinröret (*sinus prostaticus*). Prostata delas in i en kropp (*corpus*) och en höger och vänster lob (*lobus dexter et sinister*), vilka avskiljs från corpus av en fåra på respektive sida (Schaller, 2007). *Pars disseminata prostatae* är prostatas utspridda delar som hittas insprängt i urinrörets vägg (Schaller, 2007). Vätskan som utsöndras av prostata utgör en del utav sädesvätskan. Prostata tillför bland annat citrat och elektrolyter till sädesvätskan (Mobasheri et al., 2003).

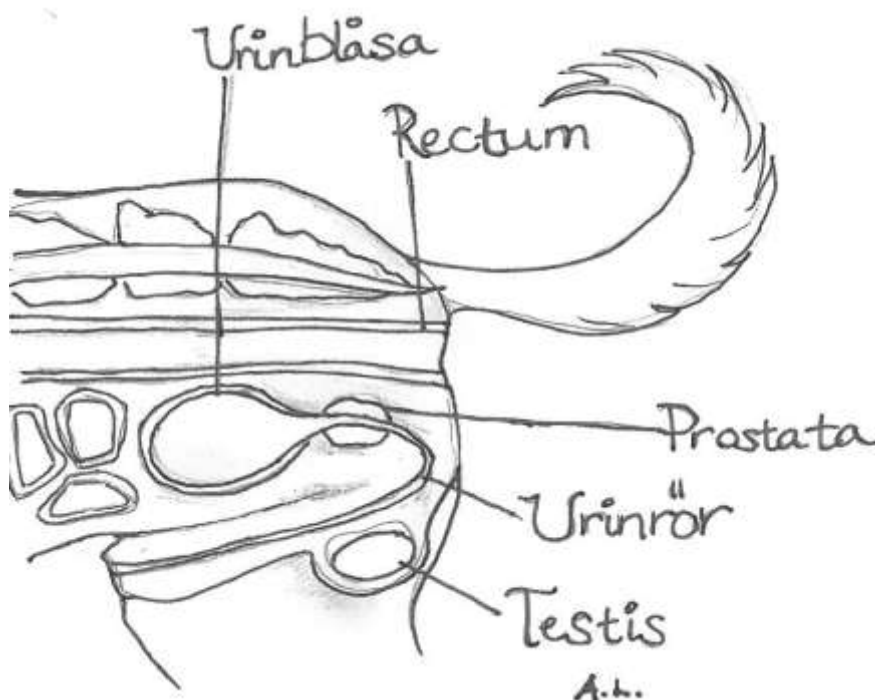


Fig 1. Schematisk översikt över prostatas läge hos hund (samtliga strukturer ej utritade).

Histologiskt karakteriseras hundens prostata av ett körtelepitel. Det utgörs utav flera acinära individuella körtlar som sträcker sig från lobernas laterala delar till de mediala delarna av prostata där uretra anförar (Lai et al., 2008 a). I anslutning till uretra ligger ett antal ductuli (små utförsgångar) inbäddade i stromat. De acinära körtlarna linjeras av ett cylindriskt epitel som blir allt mer kubiskt in mot ductuli (Lai et al., 2008 a). Stromat sträcker sig in mellan de acinära körtlarna och bildar på så sätt lobuli av parenchymet. I hundens prostata finns 15 lobuli omgivna av ett stroma bestående av kollagen och glatt muskulatur (Wientjes et al., 2005). Människans prostata innehåller mycket högre andel stromal vävnad än hundens, 44-55% jämfört med 38 % hos hund (Wientjes et al., 2005).

MATERIAL OCH METODER

Det material som använts för att sammanställa litteraturöversikten är vetenskapliga artiklar funna via sökrederkapen PubMed och Web of Knowledge. Exempel på de sökoperationer som använts är:

”(prostate OR "prostate gland") AND (dog* OR canine OR ("canine model")) AND (cancer OR neoplasia)”, 555 träffar i Pub Med.

Prioriteringar av träffarna gjordes efter titel och utgivningsår primärt. Även faktorer som artikelns åtkomlighet hade betydelse för selektionen. Artiklarnas innehåll, abstract och metodik har också granskats för att avgöra respektive artikels relevans för arbetet.

För att identifiera genhomologier mellan hund och människa har webbsidan www.ncbi.nlm.nih.gov/genes använts. Sökningar har gjorts på gennamn och djurslagsbegränsningar har använts (ex *Canis familiaris*).

LITTERATURÖVERSIKT

Immunsystemet

För att tumören ska kunna överleva i kroppen måste den inducera immunologisk tolerans (Degl'Innocenti et al., 2008). Tumörer är svåra för immunsystemet att känna igen eftersom tumörvävnad molekylärt sett är kroppsegen. Immunförsvaret känner igen tumörer utifrån deras uttryck av TAA (tumour associated antigens). Prostata tumörer kan nedreglera uttryck av TAA och förändra antigena strukturer för att undvika detektion av immunsystemet (Degl'Innocenti et al., 2008). Exempel på TAA vid prostatacancer är proteiner från onkogener såsom c-myc, protein från aktivering av suppressorgen p53, cellcykelprotein såsom cyklin A, B1 och D1 samt PSA hos människa (Casiano et al., 2006, review).

Regulatoriska T-celler (T_{reg}) har föreslagits som främsta drivkraften bakom toleransinduktion mot prostata tumörer (Degl'Innocenti et al., 2008). T_{reg} kan tysta T-hjälparceller, naturliga killer-celler och cytotoxiska T-celler. T_{reg} representerar 5-10% av T-cellspopulationen och har en avgörande roll i utvecklingen av tolerans mot kroppsegen antigen (Degl'Innocenti et al., 2008). Treg förekommer i stort antal i TDLN (Tumor Draining Lymph Nodes) och i prostata

hos TRAMP-möss (TRansgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate). Utslagning av Treg leder dock ändå till att tolerans utvecklas mot prostatatumörer hos vuxna TRAMP-möss (Degl'Innocenti et al., 2008).

Prostataceller från okastrerade hundar uttrycker immunreaktivitet mot PSA (Prostate-Specific-Antigen) luminalt, men inte PSMA (Prostate-Specific-Membrane-Antigen). Dock finns en PSMA-ortolog i hundgenomet, och transkription av denna ökar 5 ggr vid carcinom (Lai et al., 2008 a). Prostata hos kastrerade hundar kan uppvisa immunreaktivitet mot PSMA. PSMA har använts för att karakterisera carcinomcellinjen DPC-1 från hund, så markören har observerats in vitro (Lai et al., 2008 a). Genen som kodar för en motsvarighet till PSA hos hund har inte hittats ännu, men argininesteras-genen i prostata hos hund är en ortolog till PSA hos människa, då androgenberoende transkriptionsstyrande sekvenser är homologa. Uretra hos hund uppvisar immunreaktivitet mot PSMA och PSA, och PSMA har hittats i låg omfattning i såväl urotel som endotel hos människa också (Lai et al., 2008 a). Uttryck utav andra molekyler såsom cytokeratiner (CK), uroplakin III (UPIII), vimentin och High-Molecular-Weight-Cyto-Keratins, (HMWCK, innefattande CK1, CK5, CK10 och CK14) skiljer sig något mellan hund och människa normalt, men också mellan kastrerade och okastrerade hundar och hundar med eller utan PC (Lai et al., 2008 a).

Androgenreceptorns betydelse

Hos hund liksom hos människa förekommer cancer i prostata främst hos äldre patienter. PC hos både hund och människa har en tendens att metastasera till benvävnad, lungvävnad och regionala lymfknutor (Lai et al., 2009). Något som skiljer hundpatienter från humanpatienter med PC är att denna tumörform är initialt känslig för androgenbrist hos människa (Lai et al., 2009). Förekomst av androgener är dock nödvändig för prostatas normala tillväxt hos juvenila hundar, och i prostata omvandlas testosteron till det mer potenta hormonet dihydrotestosteron (DHT) via enzymet 5 α -reduktas (Shidaifat, 2009).

PC förekommer hos såväl kastrerade som icke-kastrerade hundar, men incidensen är mycket högre hos kastrerade hundar (Odds ratio=4,34, 95 % CI enligt Teske et al., 2002). I prostata hos kastrerade hundar och hos hundar med PC nedregleras androgenreceptorn hos celler i både ductulärt och acinärt epitel (Lai et al., 2009). Hos okastrerade hundar uttrycks androgenreceptorn (AR) i 10-15% av de stromala cellerna i prostata normalt. Efter kastration avtar uttryck av androgenreceptorn helt i prostatas stromala celler (Lai et al., 2009). I epiteliala celler i prostata kan androgenreceptorn uttryckas hos såväl kastrerade som icke-kastrerade PC-patienter, men då i cytoplasman snarare än i nukleus (Lai et al., 2009). Närvaro av androgener krävs för att androgenreceptorn ska dimeriseras och translokeras in i cellkärnan, vilket ger en förklaring till varför receptorn förekommer i cytoplasman hos kastrerade patienter då kastration sänker androgennivåerna (Lai et al., 2009).

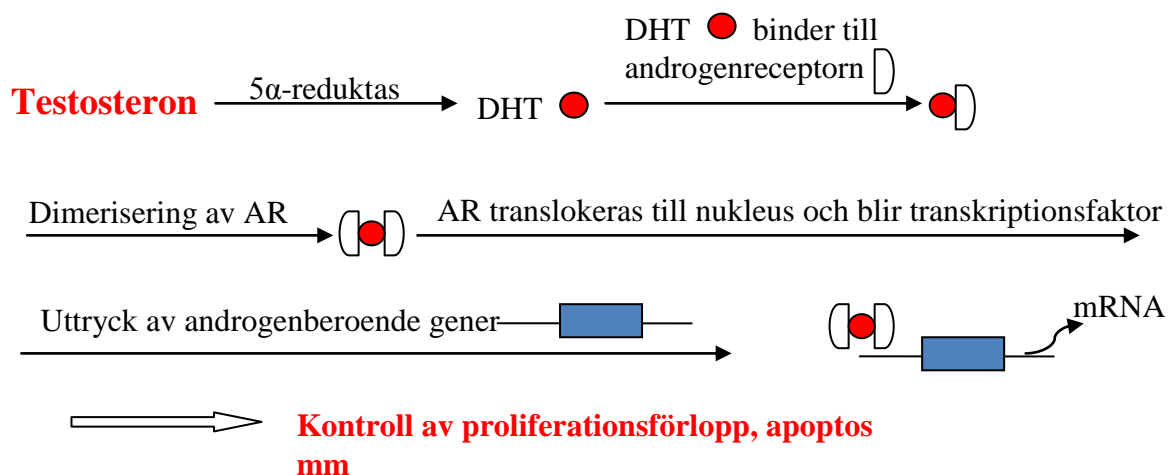


Fig 2. Androgenreceptors verkningsmekanismer, fritt från Lai et al., 2009 och Shidaifat 2009.

Hos människa har amplifikation av androgenreceptorn observerats på såväl RNA- som DNA-nivå hos patienter med androgenberoende PC (Lai et al., 2009). Androgenberoende PC uppträder som recidiv efter initiala androgenberoende tumörer, och androgen-antagonister är ett behandlingsalternativ för den initiala tumören. Mutationer i genen som kodar för androgenreceptorn har observerats hos 10-20% av humana patienter med PC (Lai et al., 2009). Mutationer i androgenreceptorn kan ses hos kastrerade hundar och humana patienter behandlade med flutamid (androgen-antagonist). Följden av mutationen blir att receptorns sensibilieras för bindning av androgener, och därmed kan binda androgener vid lägre koncentration (Lai et al., 2009).

Betydelsen av prostaglandiner

Prostaglandin G/H syntas (PGHS) är det hastighetsbestämmande steget i den endogena prostaglandinsyntesen (Boutemmine et al., 2002). PGHS går även under namnet cyklooxygenas (COX). COX-enzymet finns i två isoformer; COX-1 (PGHS-1) och COX-2 (PGHS-2). COX-1 tros ha en konstitutionell funktion i kroppen, medan COX-2 är den isoform som främst induceras vid inflammation och som under blastocyststadiet har betydelse för utvecklingen av immunsystemet (Fosslie 2000., review). COX-2 induceras också i olika tumörvävnader och främjar där bildning av prostaglandiner (Fosslie 2000., review). Produktion av prostaglandiner har satts i samband med olika cancertillstånd, fram för allt vid familiär adenomatös polypos. Det har visats på möss att knock-out av COX-2 genen leder till 86 % reduktion av polyper i tarmen jämfört med möss med COX-2 genen (Boutemmine et al., 2002).

Utbredningen av PGHS två isoformer har studerats hos såväl friska hundar som hundar med adenocarcinom. COX-1 uttrycks i stromal vävnad (fibroblaster och endotel) hos både friska hundar och hundar med PC (Tremblay et al., 1999). COX-2 uttrycks inte i prostata hos friska hundar, men kan detekteras i körtelvävnad hos hundar med PC (Tremblay et al., 1999).

Induktion av COX-2 i PC-celler hos hund har också setts in vitro. COX-2 kan induceras i PC-celler från hund som svar på cytokinpåverkan (ex IL-1, TNF α), samt bakteriella komponenter som lipopolysaccharid (LPS) i cellväggen hos gramnegativa bakterier. Även protein från oncogenerna ras och scr kan inducera COX-2 (Boutemmine et al., 2002). Även PGE₂-syntesen ökar som svar på LPS, TNF α och PMA (phorbol-12-myristate-13-acetat) in vitro (Boutemmine et al., 2002). Tystande av COX-2 uttrycket genom RNA-interferens ger nedreglering av androgenreceptorn, cyklin D1 och cellcykelarrest i cancerceller från prostata hos mus och människa in vitro (Narayanan et al., 2006). Nedreglering av COX-2 ger också ökat uttryck av p21 och p27, vilket främjar cellcykelkontrollen (Narayanan et al., 2006).

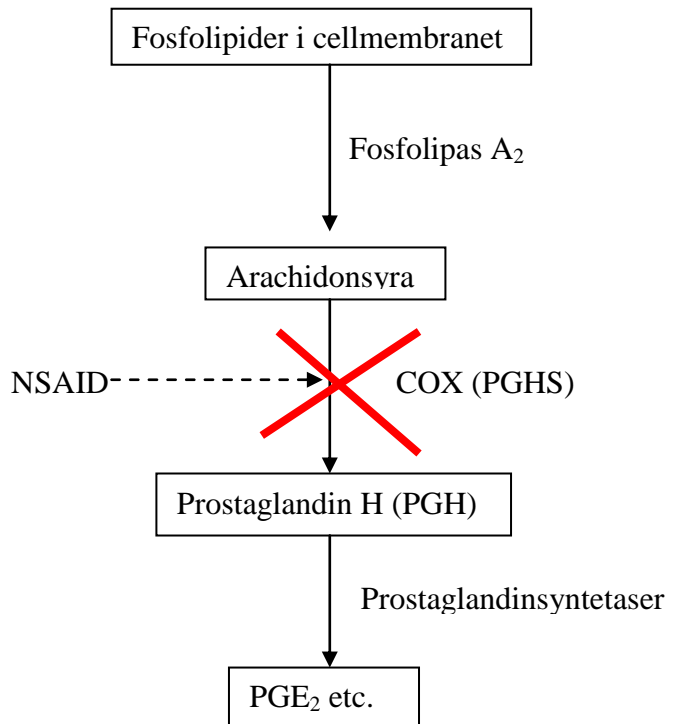


Fig 3. COX-enzymernas inverkan i prostaglandinsyntesen och effekten av NSAID-preparat, fritt från Fosslien, 2000 och Boutemmine et al., 2005.

Suppressorgener

Vid PC kan inte produktionen av sädesvätska upprätthållas på en normal nivå. För att sädesvätska ska kunna bildas krävs att natrium/kalium-pumpens (Na/K-pumpens) funktion upprätthålls (Mobasheri et al., 2003). Genom hydrolys av ATP ger Na/K-pumpen ett upptag av 2 kaliumjoner in i cellen och 3 natriummolekyler skickas ut (Mobasheri et al., 2003). Na/K-nivåerna tjänar som osmoregulatoriska parametrar, och har därför ett direkt inflytande på mängden sädesvätska som produceras. Ett aktivt inflöde av natrium är nödvändigt för transport av aspartat in i prostata (Mobasheri et al., 2003). Från glukos bildas acetyl-coenzym A och via aspartat bildas oxaloacetat i mitokondrien. Dessa komponenter behövs för att syntetisera citrat ska upprätthållas. Na/K-pumpen aktiveras på transkriptionell nivå av androgener (Mobasheri et al., 2003). Vid PC med låg differentieringsgrad uttrycks Na/K-pumpen i lägre omfattning än i normal prostatavävnad. I PC med högre differentieringsgrad uttrycks pumpen i högre omfattning relativt lågradigt differentierade carcinom. Detta förklarar till stor del varför mängden sädesvätska, och koncentrationen av citrat i sädesvätskan, sjunker vid PC (Mobasheri et al. 2003).

Hos humana patienter med höggradigt PC har nedreglering av genen U19/Eaf2 detekterats, och den kan ha betydelse som suppressorgen (Xiao et al., 2008). U19 står för Upregulated gene 19 och Eaf2 är en förkortning för ELL-associated factor 2. U19/Eaf2 och dess homolog Eaf1 har betydelse för transkriptionell kontroll i cellcykeln (Xiao et al., 2008). På råtta har det

visats att U19 uppreglas i närvaro av androgener. U19/Ea2f uttrycks främst i epitel och inte i stromala celler, varför genen främst har betydelse vid carcinom (Xiao et al., 2008).

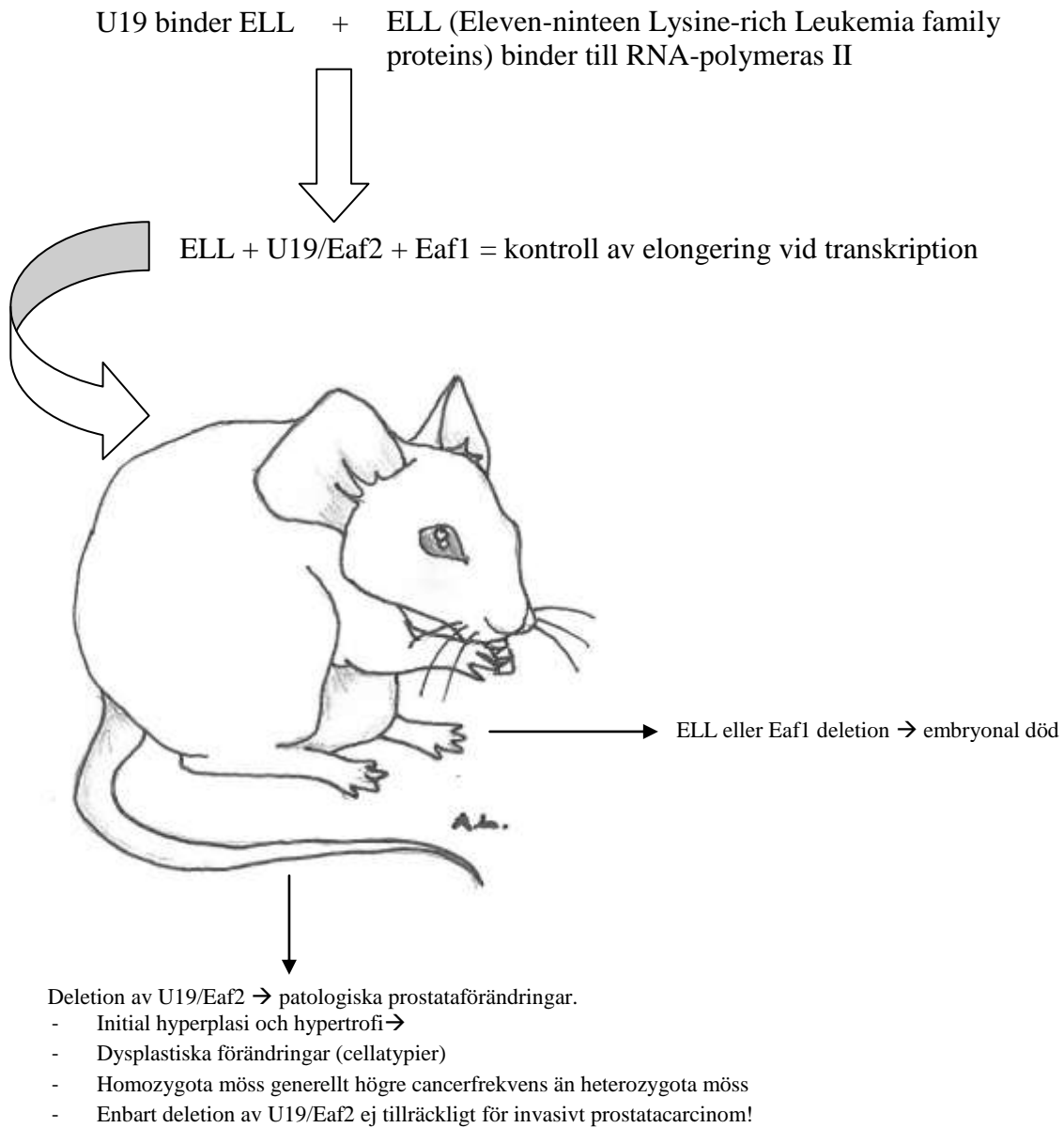


Fig 4. Inverkan av U19/Eaf2-förlust hos TRAMP-möss, fritt från Xiao et al., 2008.

Decorin är en leucin-rik proteoglykan som har inverkan på fibrillbildningen av kollagen (Hu et al., 2009). Decorin bildas främst av bindvävsceller. Uttryck och fosforylering av EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) minskar markant hos decorinbehandlade cancerceller. Detta resulterar i att signalvägarna för aktiva EGFR stängs av. Decorin hindrar uttryck och nukleär translokation av androgenreceptorn (Hu et al., 2009). Normalt accelererar EGFR och AR varandras effekter: EGF (EGFRs ligand) kan öka uttryck av AR, och DHT (ARs ligand) kan främja fosforylering av EGFR. Decorin hindrar kommunikationen mellan AR och EGFR, och har på så vis en synergistisk effekt (Hu et al., 2009). Intakta signalsystem via EGF och DHT förhindrar apoptos, och därför främjas apoptos genom decorins hämmande effekt på EGF och DHTs signalvägar. Hämning av EGFR och AR förhindrar fosforylering i PIP3/Akt vägen, och detta leder till celldöd (Hu et al., 2009).

Uttryck av decorin i cancerceller *in vitro* leder till starkt hämrad tillväxt och minskad DNA-syntes hos såväl androgenberoende som androgenoberoende humana cancercellinjer (Hu et al., 2009). *In vivo* ger decorinpåverkan mindre invasiva PC-tumörer och högre apoptosfrekvens (Hu et al., 2009). Tumörceller, framför allt tumörceller av epitelialt ursprung, har starkt hämrat eller inget uttryck alls av decorin. Decorin uttrycks inte vid PC och är en potentiell suppressorgen. (Hu et al., 2009).

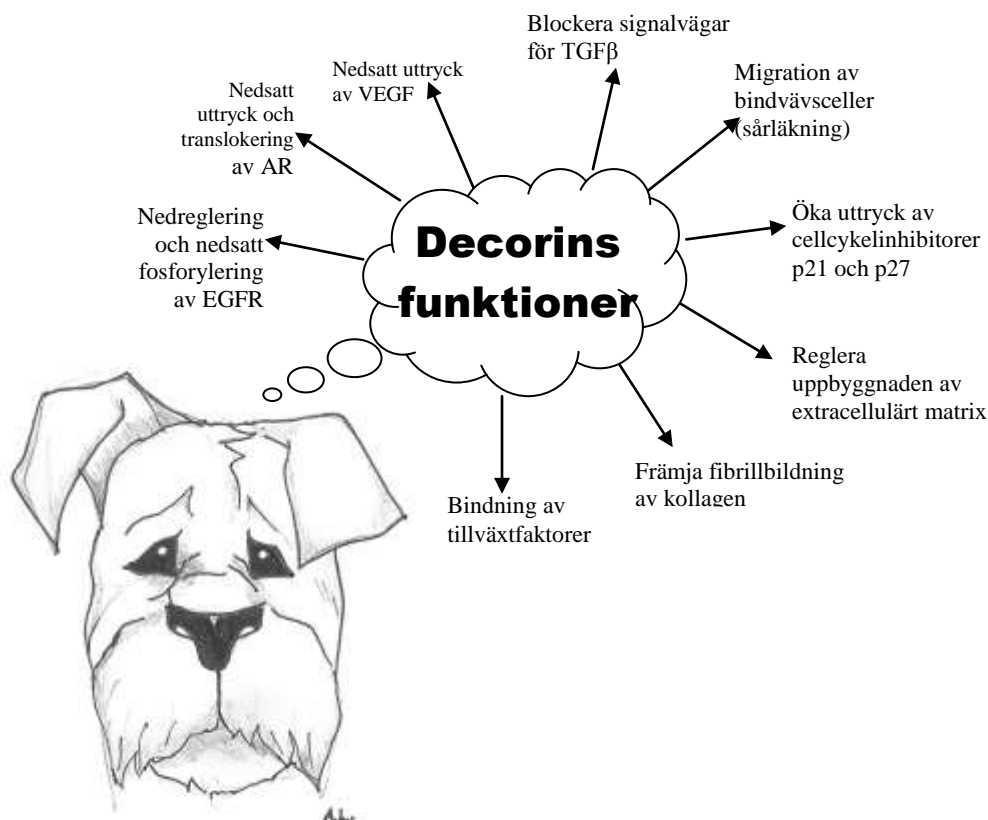


Fig 5. Decorins funktioner, fritt från Hu et al., 2009.

Onkogener

Hepatocyte Growth Factor (HGF) är en tillväxtfaktor som framförallt har effekt på epiteliala celler. HGF utövar sin effekt genom att binda till receptorn Met, ett tyrosinkinase (Gmyrek et al., 2001). Met-receptorn sitter i epitelet och HGF utsöndras främst av stromala celler i prostata. Hur cellen svarar på HGF beror på celltyp. Normal epitelial vävnad i prostata hämmas av HGF (Gmyrek et al., 2001). Vid bindning av HGF till normalt prostataepitel sker en ihållande fosforylering i MAPK-vägen (Mitogen Activated Protein Kinase), vilket leder till hämning av proliferation. Bindning av HGF till Met-receptorn på maligna, transformerade epitelceller från prostata leder dock till proliferation av desamma (Gmyrek et al., 2001). Met-receptorn uttrycks i störst omfattning i basala epitelceller i ductuli och acini. Avsaknad av fungerande Met-receptor leder till sänkt tillväxthastighet och apoptotisk celldöd hos cancerceller in vitro (Shinomiya et al., 2004).

Deletion av genen Pten kan ses i 30 % av humana PC och Pten anses därför vara en viktig suppressorgen med betydelse för tumörutvecklingen hos humana patienter (Kim et al., 2009). Möss med heterozygot deletion i Pten-locus och samtidigt överuttryck av onkogenen c-myc uppvisar högre grad av malignitet i transformerade prostataceller jämfört med möss som enbart uttrycker c-myc (Kim et al., 2009). Celler med enbart deletion av Pten uppvisar lägre grad av patologisk malignitet än Pten-defekta som uttrycker c-myc i hög omfattning (Kim et al., 2009). Överuttryck av c-myc leder till ökad celledning, och deletion av Pten har synergistisk effekt på proliferationen. Dock kan Pten-förlust leda till aktivering av p53, och på så vis bromsas förloppet (Kim et al., 2009).

Hos 90 % av humana PC-patienter som överuttrycker oncogenen ERG är ERG fuserad med promotorn TMPRSS2. Pflueger et al (2009) granskade 101 humana prostatacancerpatienter och fann då att 34 % av patienterna hade ERG-TMPRSS2-fusionen. 3 av männen som överuttryckte ERG-mRNA uppvisade fusion mellan exon 1 SLC45A3 och exon 4 på ERG (Pflueger et al., 2009). Det vanligaste är dock att fusion sker mellan exon 1 på TMPRSS2 och exon 4 på ERG hos människa. En patient med ERG-överuttryck uppvisade inte fusion mellan ERG och TMPRSS2 eller SLC45A3, utan med NDRG1. NDRG1 står för N-myc DownRegulated Gene family 1. Funktionen hos NDRG1 är att styra celledifferentiering, och dess uttryck tystas av onkogenerna c-myc och N-myc (Pflueger et al., 2009). Den gemensamma nämnaren mellan de tre fusionsmöjligheterna i ERG-locus är att uttrycket av TMPRSS2, SLC45A3 och NDGR1 är androgeninducerat. Genuttrycket avtar vid behandling med flutamid (androgen-antagonist). PSA-uttryck är dock inte korrelerat till uttryck av ERG-mRNA (Pflueger et al., 2009).

DISKUSSION

Patogenesen för PC hos hund tycks vara ett mycket komplext förlopp. De aspekter som diskuteras i detta arbete är inte på något sätt uttömmande, men ger förhoppningsvis en översikt om vilka faktorer som kan vara av vikt för utveckling av PC hos hund.

Innan tumörsjukdom kan uppstå måste tumören undfly immunförsvarets reaktion på de transformerade cellerna. Därför är uttrycket av effektiva TAA essentiellt för effektiv bekämpning av tumören. TAA kan sammanfattningsvis utgöras av onkogen produkt, muterade genprodukter av normala proteiner eller normala proteiner som förekommer i för hög mängd och på fel ställe. Vid cancer är det ofta intracellulära produkter som utgör de viktigaste TAA för immunsystemet (Casiano et al., 2006, review). Rekrytering av T_{reg} har observerats kring tumörer och TDLN, men induktion av tolerans genom utslagning av T_{reg} hos möss har tidigare misslyckats (Degl' Innocenti et al., 2008). Dock bekräftade Degl' Innocenti et al (2008) att T_{reg} tycktes vara närvarande i stor mängd i området kring tumören, vilket ändå tyder på att de har en del i immunförsvaret vid tumörbekämpning. Huruvida T_{reg} gynnar tumörens tillväxt eller bekämpar densamme verkar dock oklart och mer forskning krävs innan säkra slutsatser kan dras.

En immunohistokemisk observation som skiljer hundens normala prostata från människans är bristen på uttryck av den basala cytokeratinen CK14 och på lumbal uttryck av vimentin hos hund. Vid transformation tycks dock PC-celler hos hund kunna uttrycka både luminala cytokeratiner såsom CK8 och CK18, samt basala cytokeratiner såsom HMWCK och CK14. Betydelsen av detta är oklart, men det kan tydas som att cellerna genomgår dedifferentiering.

Vid kastration ökar antalet HMWCK-positiva celler hos hund, och epitelet blir mer tubulärt än acinärt. Dessutom uttrycks UPIII och CK7 även i körtelepitelet hos kastrerade hundar. Detta indikerar att dessa celler tillhör ductuli och ersätter körtelepitelet vid kastration, då UPIII och CK7 hittas enbart i urotel och ductuli i direkt anslutning till uretra hos hund (Lai et al., 2008 a). En tolkning är att epitelet inte enbart genomgår en histologisk atrofi, utan även är på väg mot en metaplastisk förändring. Möjligtvis har detta ett samband med det faktum att kastrerade hundar löper högre risk för PC än okastrerade hundar, eftersom uttryck av CK18 till stor del förloras vid kastration. Uttryck av CK18 är ett tecken på högre differentieringsgrad hos cellerna, då denna cytokeratin främst förekommer lumbal (Lai et al., 2008 a). PC-celler hos hund kan också uttrycka UPIII och CK7, vilket pekar på ett ductulärt ursprung. PC-cellerna förvärvar förmåga att uttrycka luminala och basala cytokeratiner samtidigt, vilket är en möjlig malignitetsfaktor om man jämför dem med celler från en frisk kastrerad hund. Cancercellerna kan också uttrycka molekyler som binder till PSA- och PSMA-antikroppar, men vilken betydelse detta har i TAA-sammanhanget för hund är osäkert.

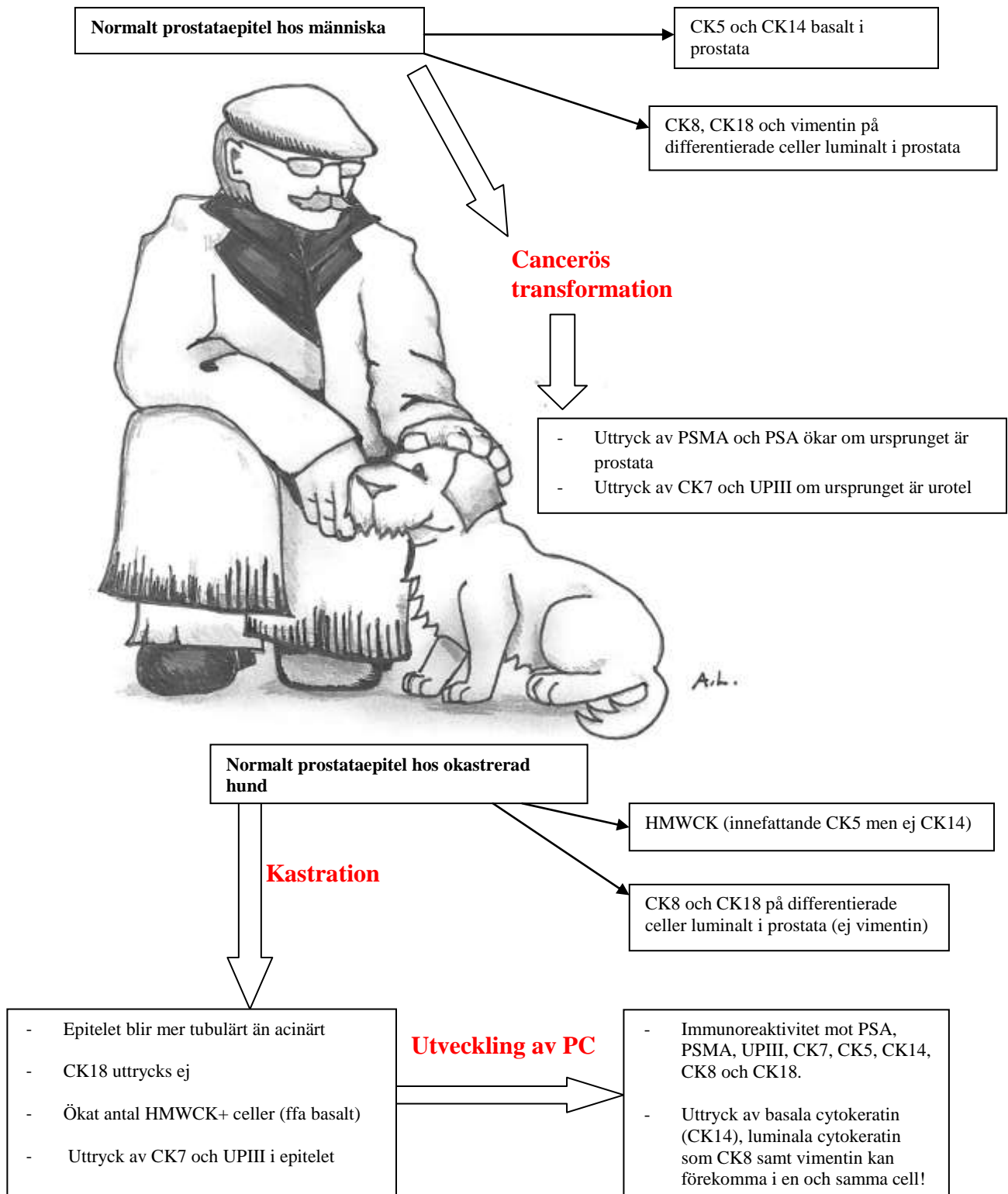


Fig 6. Molekylärt uttryck i prostata hos hund och människa, fritt från Lai et al., 2008 a och b samt Grieco et al., 2003.

Nuvarande forskning pekar på att androgenreceptorn har en avgörande betydelse för utveckling av PC. Gemensamt för kastrerade hundar och humana patienter som genomgått behandling med androgenantagonister är att mutationer har observerats i androgenreceptorn. Mutationerna gör receptorn känsligare för ligandbindning (Lai et al., 2009). Lai et al (2009) hävdar att mutationer i androgenreceptorn kan vara förklaringen till bristande translokation av androgenreceptorn in i kärnan hos hundar med PC. Brist på translokation av receptorn har även observerats på humana patienter med androgenoberoende PC. Lai et al (2008 a) fann att kastrerade hundar näst intill saknade uttryck av androgenreceptorn i vissa epitelceller, medan den uttrycktes i viss omfattning i andra och då främst i cytoplasman. Androgenbrist kanske kan frammana mutationer i androgenreceptorn som gör den känsligare för ligandbindning. Dock kanske inte androgenbrist ansvarar för eventuella mutationer som motverkar translokation av receptorn till kärnan. Cytoplasmiskt uttryck av androgenreceptorn har observerats även hos okastrerade hundar med PC.

Uttrycket av androgenreceptorn hos humana PC-patienter beskrivs vara heterogent och inte korrelerat till tumörens progressionsgrad (Lai et al., 2009). Därför kan inte uttryck av androgenreceptorn användas som förklaring till transitionen från androgenberoende till androgenoberoende PC hos människa. Kanske är det inte brist på uttryck av androgenreceptorn som bidrar till malignitetsprogression hos tumören, utan snarare felaktigt uttryck i cytoplasman? Androgenreceptorns påverkan på prostatas körtelvävnad är någonting som bör beaktas, särskilt i valet av hund som modelldjur för människa i studier av PC. Detta blir särskilt relevant med tanke på att människans PC initialt är androgenberoende, och sedan övergår i ett androgenoberoende stadium. Att kastrerade hundar har högre incidens av PC jämfört med okastrerade hundar styrker ytterligare argumentet att det är cytoplasmiskt uttryck av androgenreceptorn som bidrar till cancerutvecklingen. Huruvida detta är sant för humana patienter är oklart, men cytoplasmiskt uttryck av AR har observerats, framförallt vid hormonoberoende tumörer. Därför är denna hypotes något som kanske bör undersökas närmare, särskilt som humana patienter initialt behandlas med androgenantagonister såsom flutamid.

Det har visats, *in vitro* av Boutemmine et al (2002) och *in vivo* av Tremblay et al (1999), att cancerceller från adenocarcinom i prostata har en förmåga att inducera produktion av enzymet COX-2. Uttryck av COX-2 leder till apoptosresistens hos tumörceller från carcinom i colon och juervävnad (Fosslien, 2000, review). Det är möjligt att detta gäller även för PC-celler. Angiogenesen i tumörvävnad är också beroende av att det växande endotelet uttrycker COX-2. På detta sätt kan tumörens tillväxt vara beroende av COX-2 uttryck. Prostaglandin E₂ (PGE₂) har visat sig vara av särskild vikt för tumörcellernas överlevnad. PGE₂ är en immunosuppressiv prostaglandin och endogen produktion av PGE₂ är ett sätt för tumören att undvika detektion från immunsystemet. COX-2 kan induceras av inflammatoriska mediatorer såsom TNF α , vilket är ett viktigt fynd om man beaktar PC som en progression från en initial inflammatorisk process. Detta särskilt med avseende på behandling, då NSAID-preparat är ett led i bekämpningen av PC.

Nedreglering av COX-2 leder till nedsatt uttryck av cyklin D1 och androgenreceptorn hos celler in vitro (Narayanan et al., 2006). Dessa resultat indikerar att COX-2 kan vara ett sätt för cellerna att främja sin egen proliferation. Intressant nog avtog även uttryck av androgenreceptorn då COX-2 genen tystades. Försöket gjordes på celler från mus och människa. Det är möjligt att dessa resultat därför inte kan översättas till hund, men de är intressanta eftersom de frammanar frågeställningar om den generella patogenesen. Narayanan et al (2006) påpekar att cyklin D1 är en känd inhibitor till androgenreceptorn. Dock verkar det som att induktion av COX-2 verkar ha en regulatorisk effekt i den positiva riktningen på såväl cyklin D1 som androgenreceptorn. Det vore intressant studera om COX-2 uttryck har denna effekt även på fyrbenta patienter in vivo. Med tanke på humana tumörers heterogena uttryck av androgenreceptorn vore det också intressant att veta om COX-2 hade någon inverkan på tumörens progression från ett androgenberoende till ett androgenoberoende stadium.

Nedsatt uttryck av Na/K-pumpen vid PC har åtminstone symptomatisk påverkan på patienten eftersom det ger påverkan på fertiliteten. Ju lägre differentieringsgrad ett PC har, desto mer avtar uttrycket av Na/K-pumpen i tumörcellerna. Transkription av Na/K-pumpen är androgenberoende, och om Na/K-pumpens gen i sig kan fungera som en suppressorgen så skulle det erbjuda ytterligare underlag till varför kastrerade hundar oftare drabbas av PC.

Suppressorgen U19/Eaf2 verkar ha betydelse för PC-patienter på humansidan. U19/Eaf2 har en basal betydelse för transkriptionen, och det är troligt att även PC hos hund är beroende av att transkriptionell reglering slås ut. Medlemmar ur ELL familjen har identifierats i hundgenomet (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), och de har betydelse för elongering vid transkription. Å andra sidan kanske inte enbart ELL-deletion är tillräckligt för att PC ska utvecklas. Dock behövs djurslagsspecifik forskning för att bekräfta eller förkasta denna hypotes.

Bindning av HGF till Met-receptorn har betydelse för carcinomcellernas proliferation. Met-receptorn är ett exempel där ligandbindning har motsatt effekt på cancerceller jämfört med normala celler. Bindning av HGF till Met-receptorn på normala celler leder till att proliferation hämmas och differentiering främjas. Detta kan också ses immunohistokemiskt genom ökat uttryck av CK18. Carcinomceller prolifererar dock som svar på HGF-bindning till Met-receptorn. Met-receptorn verkar vara essentiell för cancercellens överlevnad, åtminstone in vitro. Möjligtvis är inte Met-receptorn av stor vikt för själva transformationen av den normala epitelcellen till carcinomcell, men den verkar vara av stor vikt för cellens överlevnad när den väl blivit transformerad. Met-receptorn uttrycks framförallt i basala celler med lägre differentieringsgrad, och det kanske är vid transformation av dessa som Met-receptorn har inverkan.

Det har visats på möss att Pten och c-myc kan samverka i onkogenesen för att skapa mer höggradigt förändrade tumörer. Dessa gener finns i såväl hundens som människans genom. Onkogenen c-myc kan hjälpa tumörens framfart genom att främja proliferation, men det verkar som att c-myc-positiva cancerceller men samtidig Pten-förlust förvärvar egenskaper som gör att de kan utkonkurrera celler inom samma tumör (Kim et al., 2009). Pten-förlust kan

aktivera proapoptotiska vägar och cellsenescens via p53, men aktivering av c-myc i dessa celler leder till att cellen återigen kan proliferera då cellcykelarrest via p21 slås ut. Resultaten från Kim et al (2009) visar att c-myc+ och Pten- celler inte räddas från apoptos, då PUMA-vägarna fortfarande är aktiva. Kanske är det så, att den ökade proliferationshastigheten som cellen får genom c-myc överväger de proapoptotiska PUMA-signalerna. Isåfall är det också troligt att det är en sådan mekanism som ger c-myc+ och Pten-celler övertag över celler med enbart Pten-förlust.

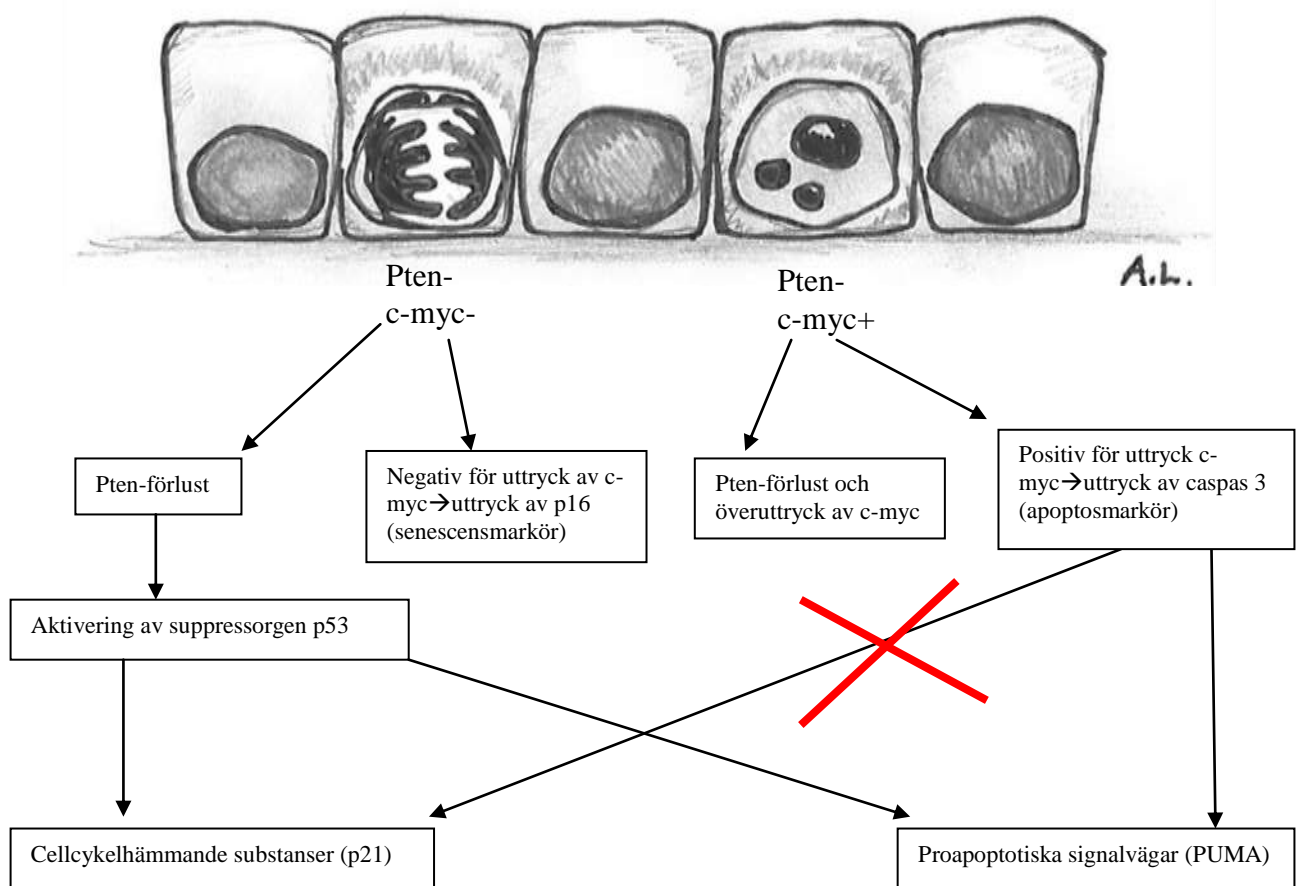


Fig 7. Konsekvenserna av Pten-förlust och Pten-förlust med samtidigt uttryck av c-myc, fritt efter Kim et al., 2009.

ERG-genen tillhör ETS-familjen och tycks ha en betydande roll för utveckling av PC hos humana patienter. Hundens genom saknar TMPRSS2-sekvensen, men innefattar gener ur ETS-familjen (www.ncbi.nlm.nih.gov). SLC45A3 och NDRG1 har sin motsvarighet i hundgenomet. Därför skulle en komparativ studie över inverkan av SLC45A3 och NDRG1 i carcinogenesisen vid PC hos hund vara av intresse. Eftersom uttryck av SLC45A3 och NDRG1 är androgenberoende hos människa vore det lärorikt att studera om uttryck av gensegmenten skiljer sig mellan kastrerade och okastrerade hundar. Särskilt intressant är NDRG1-sekvensen, eftersom den tystas av onkogenerna n-myc och c-myc. Därför är det intressant att ponera huruvida onkogenes innefattande c-myc (och Pten), utesluter inverkan av NDRG1.

Decorin är en avgörande molekyl för uppbyggnaden av tumörens infrastruktur. Genom deletion av decorin främjas uttryck av VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), vilket främjar angiogenesen i tumören. Således kan uttryck av decorin vara ett sätt för kroppen att avgränsa en tumör. Signalvägar för TGF β öppnas upp då decorin inte längre uttrycks. Förvisso kan TGF β hindra tumörtillväxt via sin typ-I-receptor, men mer intressant vid PC är att TGF β kan inducera COX-2 via sin typ-II-receptor (Fosslie, 2000, review). Decorin kodas av DCN-genen och den finns i hundens och människans genom (www.ncbi.nlm.nih.gov).

En intakt decorin-gen leder till att fosforylering av EGFR förhindras och translokering av AR in i kärnan avtar. Sammantaget stängs signalvägarna av för EGFR och AR av. Då AR och EGFR dessutom främjar varandras signalvägar får decorinförlust en synergistisk effekt, och cellen går in i en anti-apoptotisk fas. AR uttrycks cytoplasmiskt och i lägre omfattning vid PC. Därför är det troligt att decorin främst har betydelse som suppressorgen avseende samspelet mellan EGFR och AR. Det krävs förstås mer än en deletion av en suppressorgen för att cancer ska uppstå, och effekten av deletion av decorin och samtidigt förvärvande av onkogener som c-myc är föga utrett.

För att PC ska progrediera krävs att tumören lyckas undfly immunsystemet. Många gener och mekanismer samverkar för att carcinogenesen ska fortskrida till invasivt PC. Patogenesen för PC hos hund är mycket komplex och många frågetecken kvarstår. Därför krävs mer forskning inom detta område, inte enbart på individuella gener, utan även på samspelet dem emellan.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Boutemmine D, Bouchard N, Boerboom D, Jones HE, Goff AK, Doré M, Sirois J. (2002). Molecular characterization of canine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation in prostatic adenocarcinoma cells in vitro. *Endocrinology* 143(3), 1134-1143.
- Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM. (2006). Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Molecular Cell Proteomics* 5(10), 1745-1759, Review.
- Degl'Innocenti E, Grioni M, Capuano G, Jachetti E, Freschi M, Bertilaccio MT, Hess-Michelini R, Doglioni C, Bellone M. (2008). Peripheral T-cell tolerance associated with prostate cancer is independent from CD4+CD25+ regulatory T cells. *Cancer Research* 68(1), 292-300.
- Fosslien E. (2000). Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 37(5), 431-502.
- Gmyrek GA, Walburg M, Webb CP, Yu HM, You X, Vaughan ED, Vande Woude GF, Knudsen BS. (2001). Normal and malignant prostate epithelial cells differ in their response to hepatocyte growth factor/scatter factor. *The American Journal of Pathology* 159(2), 579-590.
- Grieco V, Patton V, Romussi S, Finazzi M. (2003). Cytokeratin and vimentin expression in normal and neoplastic canine prostate. *Journal of Comparative Pathology* 129(1), 78-84.
- Hu YP, Sun HG, Owens RT, Wu JS, Chen YQ, Berquin IM, Perry D, Edwards IJ. (2009). Decorin Suppresses Prostate Tumor Growth through Inhibition of Epidermal Growth Factor and Androgen Receptor Pathways. *Neoplasia* 11(10), 1042-1053.
- Kim J, Eltoum IE, Roh M, Wang J, Abdulkadir SA. (2009). Interactions between Cells with Distinct Mutations in c-MYC and Pten in Prostate Cancer. *PLoS Genetics* 5(7), doi: e1000542.
- Lai C.L, van den Ham R, van Leenders G, van der Lugt J, Teske E. (2008). Comparative characterization of the canine normal prostate in intact and castrated animals. *Prostate* 68(5), 498-507. Referens (Lai et al., 2008 a) i ovanstående text.
- Lai CL, van den Ham R, van Leenders G, van der Lugt J, Mol JA, Teske E. (2008). Histopathological and immunohistochemical characterization of canine prostate cancer. *Prostate* 68(5), 477-488. Referens (Lai et al., 2008 b) i ovanstående text.
- Lai CL, van den Ham R, Mol J, et al. (2009). Immunostaining of the androgen receptor and sequence analysis of its DNA-binding domain in canine prostate cancer. *Veterinary Journal* 181 (3), 256-260.
- Mobasheri A, Fox R, Evans I, Cullingham F, Martín-Vasallo P, Foster CS. (2003). Epithelial Na, K-ATPase expression is down-regulated in canine prostate cancer; a possible consequence of metabolic transformation in the process of prostate malignancy. *Cancer Cell International* 3(1), doi: 10.1186/1475-2867-3-8.
- Narayanan BA, Narayanan NK, Narayanan, Davis L, and Nargi D. (2006). RNA interference-mediated cyclooxygenase-2 inhibition prevents prostate cancer cell growth and induces differentiation: modulation of neuronal protein synaptophysin, cyclin D1, and androgen receptor *Molecular Cancer Therapy* 5(5), 1117-1125.

- National Center for Biotechnology Information , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (2010-03-24).
- Pflueger D, Rickman DS, Sboner A, Perner S, LaFargue CJ, Svensson MA, Moss BJ, Kitabayashi N, Pan Y, de la Taille A, Kuefer R, Tewari AK, Demichelis F, Chee MS, Gerstein MB, Rubin MA. (2009). N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) is fused to ERG in prostate cancer. *Neoplasia* 11(8), 804-811.
- Schaller O. (2007). *Illustrated Veterinary Anatomical Nomenclature*. 2nd ed. Stuttgart: Enke. 198-210.
- Shidaifat F. (2009). Age dependent expression of 5alpha-reductase and androgen receptor mRNA by the canine prostate. *Physiological Research* 58(1), 155-158.
- Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, Gustafson M, Waters DJ, Zhang YW, Vande Woude GF. (2004). RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival. *Cancer Research* 64(21), 7962-7970.
- Teske E, Naan EC, van Dijk EM, Van Garderen E, Schalken JA. (2002). Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197(1-2), 251-255.
- Tremblay C, Doré M, Bochsler PN, Sirois J. (1999). Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 91(16), 1398-1403.
- Xiao W, Zhang Q, Habermacher G, Yang X, Zhang AY, Cai X, Hahn J, Liu J, Pins M, Doglio L, Dhir R, Gingrich J, Wang Z. (2008). U19/Eaf2 knockout causes lung adenocarcinoma, B-cell lymphoma, hepatocellular carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *Oncogene* 27(11), 1536-1544.