

Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Serum(-5,-7) pro PSA zur Differenzierung von Stadium und
Grading des Prostatakarzinoms**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Eva-Maria Paul
aus Magdeburg

Gutachter: 1. PD Dr. med. Carsten Stephan
2. Prof. Dr. med. Franz Recker
3. PD Dr. med. Martin Schostak

Datum der Promotion: 14.06.2009

Widmung

Für Maximilian

Abkürzungsverzeichnis

ACT-PSA	α -1-Antichymotrypsin-PSA Komplex
API-PSA	PSA gebunden an α -1-Proteaseinhibitor
A2M-PSA	α -2-Makroglobulin-PSA Komplex
ANN	artifizielles neuronales Netzwerk
BPH	benigne Prostatahyperplasie
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cPSA	gebundenes (complexed) PSA
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DRU	digitale rektale Untersuchung
fPSA	freies ungebundenes PSA
fPSAi	enzymatisch inaktives fPSA
%fPSA	prozentuales freies PSA oder fPSA/tPSA
KLK	humanes Kallikrein
mRNA	messenger RNA
o.a.	oben angeführt
PAP	prostataspezifische alkalische Phosphatase
p-Wert	Signifikanzwert
PCa	Prostatakarzinom
proPSA	Vorstufe des enzymatisch aktiven PSA (244 Aminosäuren)
PSA	prostataspezifisches Antigen
ROC	receiver operating characteristic
tPSA	totales prostataspezifisches Antigen (Gesamt-PSA)
TRUS	transrektaler Ultraschall
u.U.	unter Umständen
z.T.	zum Teil
zzt.	zurzeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Allgemeine Angaben zum Prostatakarzinom: Ausgangspunkt der vorliegenden Dissertationsschrift	7
1.2	Prostata-spezifisches Antigen	9
1.2.1	Biochemie und physiologische Funktion des PSA	9
1.2.2	Einflussfaktoren auf PSA und freies PSA im Serum	12
1.3	Verbesserung der PSA-Aussagekraft	14
1.3.1	PSA-Anstiegsgeschwindigkeit	14
1.3.2	PSA-Verdopplungszeit	15
1.3.3	PSA im Urin	16
1.3.4	PSA-Dichte	16
1.3.5	PSA-Dichte der Transitionalzone	17
1.3.6	Altersspezifische Referenzgrenzen des PSA	18
2	Aufgabenstellung	20
3	Material und Methoden	22
3.1	Untersuchte Probanden	22
3.1.1	Karzinompatienten	22
3.2	PSA-Bestimmungen	23
3.2.1	Bestimmung von tPSA	23
3.2.2	Bestimmung von fPSA	24
3.2.3	Bestimmung von (-5, -7)proPSA	24
3.3.	Statistische Methoden	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Beziehung zwischen tPSA und pT, Grading und Gleason-Score	26
4.2	Beziehung zwischen %fPSA und pT, Grading und Gleason-Score	30
4.3	Beziehung zwischen proPSA und pT, Grading und Gleason-Score	32
4.4	Beziehung zwischen proPSA/tPSA und pT, Grading und Gleason-Score	36
4.5	Beziehung zwischen proPSA/%fPSA und pT, Grading und Gleason-Score	37
4.6	Spearman'scher Korrelationskoeffizient r_s	41
4.7	Logistische Regression	42
4.8	ROC-Kurven der einzelnen Variablen mit AUC nach pT, Grading und Gleason-Score	44
4.9	ROC-Kurven aller Variablen mit AUC nach pT, Grading und Gleason-Score-Bewertung des Regressionsmodells	47

5	Diskussion	49
5.1	Molekulare Formen des PSA: PSA-Komplexe	50
5.1.1	ACT-PSA	50
5.1.2	API-PSA-Komplex	51
5.1.3	A2M-PSA-Komplex	51
5.1.4	Komplexiertes PSA (cPSA)	52
5.2	Molekulare Formen des freien PSA	53
5.2.1	freies PSA (fPSA) und %fPSA	53
5.3	Isoformen des freien PSA	55
5.3.1	Biochemie der Isoformen des freien PSA	55
5.3.2	bPSA, fPSAi	56
5.4	proPSA-Isoformen	57
5.4.1	(-2), (-4), (-5,-7)proPSA	59
5.5	Bewertung des (-5,-7)proPSA	60
5.6	Bewertung und Ausblicke	68
6	Zusammenfassung	70
7	Literaturverzeichnis	72
8	Publikationsverzeichnis	85
	Danksagung	86
	Erklärung	87
	Lebenslauf	88

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Angaben zum Prostatakarzinom: Ausgangspunkt der vorliegenden Dissertationsschrift

In Deutschland werden derzeit jährlich etwa 48.650 Prostatakarzinome (PCa) diagnostiziert (107). So ist die Prostata mit 22,3% die häufigste Lokalisation bösartiger Neubildungen beim Mann. Bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen steht das PCa mit 10,4% an dritter Stelle. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwas über 70 Jahren, etwa 2 Jahre höher als für Krebs insgesamt. Erste Erkrankungen treten kaum vor dem 50. Lebensjahr auf. Im Vergleich mit den übrigen Ländern der EU liegen die in Deutschland ermittelten Erkrankungsraten für das PCa im oberen Bereich mit Rang 5. Die höchsten Raten finden sich in Schweden und Finnland, die niedrigsten in Griechenland, Polen und Lettland.

Die Inzidenz des PCa in den USA im Jahr 2007 betrug insgesamt 218890 Neuerkrankungen. Damit stand das PCa mit einem Anteil von 29% an 1.Stelle unter allen erfassten malignen Tumoren in diesem Zeitraum. Am PCa verstarben im gleichen Zeitraum ca. 27050 Patienten, das ist mit 9% aller erfassten Todesfälle Rang 2 nach malignen Erkrankungen von Lunge/Bronchien (41).

Bisher sind die Ursachen für die Entstehung des PCa und die den Verlauf beeinflussenden Faktoren im Wesentlichen unbekannt. Bei Männern, die in jüngerem Alter erkranken, wird eine genetische Prädisposition diskutiert, worauf die unterschiedliche Häufigkeit des PCa in verschiedenen ethnischen Gruppen ebenfalls hindeutet. Als mögliche Risikofaktoren werden Übergewicht, fett- und kalorienreiche Ernährung, Bewegungsmangel und Rauchen diskutiert (107).

Seit Ende der 1980er Jahre ist nach zuvor leicht zunehmendem bis gleich bleibendem Verlauf in Deutschland ein steiler Anstieg der Neuerkrankungsrate zu beobachten. Dieser Anstieg kann größtenteils auf den Einsatz neuer Methoden in der Diagnostik zurückgeführt werden. Dabei kommt dem prostataspezifischen Antigen (PSA) eine Schlüsselrolle zu. Autopsiestudien weisen einen großen Anteil unentdeckter, asymptomatischer PCa bei den 70- und insbesondere über 80-jährigen Männern nach, die keinen Einfluss auf die Lebenserwartung und die Lebensqualität des Betroffenen hatten. Voraussetzung für eine ergänzende Aufnahme des PSA-Tests in das gesetzliche Krebsfrüh-

erkennungsprogramm ist das Erbringen des wissenschaftlichen Nachweises seines bevölkerungsbezogenen Nutzens, d.h. der Senkung der Prostatakrebssterblichkeit. Hinsichtlich dieses Nutzens laufen derzeit zwei große randomisierte Studien, deren Ergebnisse 2008/2009 erwartet werden.

Das PCa ist der häufigste maligne Tumor der westlichen Welt. Die dargestellten Fakten belegen die Bedeutung dieser Erkrankung und erklären das zunehmende Interesse, Morbidität und Mortalität zu begrenzen. Dabei existieren 3 Ansatzpunkte. Zunächst die Verbesserung der Früherkennung durch geeignete Screeningmethoden, ebenso die Verringerung der Inzidenz durch bewusstes Vermeiden von bekannten krebsfördernden Umweltfaktoren und schließlich verbesserte Heilverfahren. Die Thematik dieser Arbeit befasst sich mit der Möglichkeit der Verbesserung der Früherkennung.

Bis zur klinischen Etablierung des PSA als Marker des PCa war die digitale rektale Untersuchung (DRU) die wichtigste Kenngröße des PCa-Screenings. Ein Defizit dieses Palpationsverfahrens besteht in seiner Subjektivität und der damit verbundenen verminderten Standardisierung. Darüber hinaus sind ca. 70% der auf diese Weise entdeckten Tumore bereits in einem lokal fortgeschrittenen bzw. metastasierten Stadium und damit einer kurativen Therapie nicht mehr zugänglich. Es stellt sich die Forderung nach effektiven, kostengünstigen Methoden, die PCa im Frühstadium detektieren, ohne dabei unnötige aggressive Diagnostik und Therapie nach sich zu ziehen. Eine wesentliche Rolle hierbei spielt die Einführung des PSA, welches seit seiner klinischen Einführung der wesentlichste Parameter zur Früherkennung des PCa ist.

In den folgenden Kapiteln 1.2 und 1.3 soll näher auf das PSA und die Möglichkeiten der Verbesserung der PSA-Aussagekraft eingegangen werden.

Der Abschnitt 2 beschäftigt sich mit aktuell bestehenden Problemen und offenen Fragen der Vorhersage von Stadium und Grading des PCa.

1.2 Prostataspezifisches Antigen

1.2.1 Biochemie und physiologische Funktion des PSA

Das prostataspezifische Antigen (PSA) ist der wichtigste heute verfügbare Tumormarker für die Früherkennung, das Staging und die Verlaufskontrolle von Patienten mit PCa (103). Nachfolgend wird zunächst der Entwicklungsweg des PSA aufgezeigt.

1971 berichteten Hara et al. (36) aus Japan über ein sogenanntes „ γ -Semiprotein“, welches im menschlichen Seminalplasma nachgewiesen werden konnte. Die Amerikaner Li und Beling (60) beschrieben 1973 ein „E 1-Antigen“ mit einem Molekulargewicht von 31000 Dalton (Da), Sensabaugh 1978 das „p30-Protein“ mit 30000 Da (119). Alle hier beschriebenen Substanzen konnten damals mittels Immunelektrophorese aus dem menschlichen Seminalplasma isoliert werden. Als Ursprungsort des „p30“ konnte durch Sensabaugh (119) bereits die Prostata lokalisiert werden. Die Arbeitsgruppe um Wang konnte 1979 mittels Immunpräzipitation ein Antigen, welches dann erstmals PSA genannt wurde, aus einem Pool von normalem, hypertrophem und malignem Prostatagewebe nachweisen (148). Sie beschrieben das PSA als prostataspezifisch und konnten sowohl immunologisch als auch chemisch einen deutlichen Unterschied zu der seit 1938 zur Prostatakarzinomdiagnostik benutzten prostataspezifischen Phosphatase (PAP) nachweisen (148). Mittels Aminosäuresequenzierung konnte 1985/1986 eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit des PSA mit Serinproteasen und Kallikreinen nachgewiesen werden (61, 149). Dem Nachweis des PSA im Seminalplasma bzw. Purifikation aus dem Prostatagewebe folgte die Bestimmung dieses Markers im Serum von Prostatakarzinompatienten (91). Sensitivere Methoden der Konzentrationsbestimmung des PSA im Serum mittels Enzymimmunoassay erlaubten die Festlegung eines ersten Referenzbereiches (50). 1986 erhielt der PSA-Test der Firma Hybritech als erstes kommerzielles PSA-Bestimmungsverfahren die Zulassung für die Verlaufsbeobachtung von Prostatakarzinompatienten nach Therapie in den USA. Das PSA entwickelte sich zum heute am weitesten verbreiteten Tumormarker.

Das PSA, auch humanes Kallikrein 3 (KLK3) genannt, gehört einer Gruppe von mittlerweile 15 sog. Kallikreinen an. Diese Familie von Proteasen (KLK1-15) zeigt ein

signifikant ähnliches genetisches Muster sowie andere Gemeinsamkeiten. Sie sind das Produkt einer 300-kb-Region des menschlichen Chromosoms 19q13.4 (154).

Das PSA wird fast ausschließlich in den Epithelzellen der Prostata exprimiert (105). Die Menge des PSA, die von den Epithelzellen der Prostata in das Drüsenlumen abgegeben wird, beträgt zwischen 10-50 $\mu\text{mol/L}$. Der Nachweis von PSA gelang im endoplasmatischen Retikulum, in den Sekretgranula sowie an der luminalen Zelloberfläche der Epithelzellen (119, 120). PSA und/oder PSA-Genexpression finden sich aber auch in geringen Mengen im Endometrium (26), gesundem Brustgewebe, Serum und Milch der Frau (155, 156), in den Periurethraldrüsen (30) sowie in malignen Zellen der Niere, Nebenniere und weiblichen Brustdrüse (59, 157). Für alle praktischen und klinischen Belange gilt jedoch das PSA als organ- aber nicht tumorspezifisch für die Prostata (103).

In der Samenflüssigkeit findet sich das PSA in sehr hohen Konzentrationen von 0,5 bis 5 g/L. Das Freisetzen des PSA direkt in den Systemkreislauf ist bei jungen, gesunden Männern bzw. Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) eher selten. Das PSA aus gesundem oder BPH-Gewebe erreicht den Systemkreislauf erst nach Proteolyse im Extrazellulärraum, in welchen es sozusagen „rückwärts“ abgeflossen ist. Bei einer Häufigkeit von weniger als einem PSA-Molekül pro einer Million sezernierter PSA-Moleküle führt das in diesem Fall zu einem niedrigen Serum-PSA-Spiegel von $<4 \mu\text{g/L}$ (127).

Auf Grund der Zerstörung der normalen Gewebsarchitektur, der Schädigung der Basalmembran im Prostatakarzinomgewebe, gelangen große Mengen des PSA nach aktiver Sekretion in das Interstitium direkt in den Systemkreislauf und führen dort zu vielfach höheren PSA-Serumkonzentrationen (91, 127). Balk und Kollegen (4) postulierten folgendes Modell der PSA-Biosynthese, wobei das hier erwähnte proPSA eine Vorstufe des aktiven PSA darstellt und erst im weiteren Verlauf ausführlich erläutert wird. Normales Epithel der Prostata drüse sezerniert PSA in das Lumen, wo das proPSA unter Mitwirkung eines bzw. mehrerer Kallikreine zu aktivem PSA umgewandelt wird. Ein Teil des aktiven PSA diffundiert in den Systemkreislauf, während der andere Teil durch Proteolyse im Drüsenlumen zu inaktivem PSA umgewandelt wird. Dieses erreicht ebenso den Systemkreislauf und zirkuliert dort als freies PSA. Der Verlust der normalen glandulären Architektur beim PCa führt zur Abnahme der proPSA-Umwandlung in aktives PSA. Dieser Umstand könnte die im Vergleich höhere proPSA-Serumkonzentration beim PCa erklären.

Das PSA-Molekül mit einem Molekulargewicht von zunächst ca. 34000 Dalton (Da) ist ein einkettiges Glykoprotein. Die Proteinsynthese erfolgt über die messenger RNA (mRNA), welche ein inaktives sogenanntes präproPSA mit 261 Aminosäuren kodiert. Die Expression von PSA-mRNA findet sich überwiegend im Prostataepithel und wird reguliert durch Androgene (153). Eine hydrophile Signalsequenz mit 17 Aminosäuren (präproRegion) wird abgespalten und es entsteht ein „Vorläufer-Protein“ mit 244 inaktiven Aminosäuren, das proPSA. Am N-terminalen Ende dieser Aminosäurekette wird physiologischerweise das 7-Aminosäurepeptid abgespalten. Dadurch entsteht dann das enzymatisch aktive freie PSA-Molekül, das aus 237 Aminosäuren besteht und dann nur noch ein Molekulargewicht von ca. 26000 Da hat (69).

Das PSA gehört zur Gruppe der Serinproteasen. In seiner Substratspezifität ist es ähnlich dem Chymotrypsin mit vergleichbar hydrolytischer Aktivität in Bezug auf die Carboxylgruppen von Leucin und Tyrosin (149).

Das PSA zirkuliert im Serum sowohl als freies, nicht gebundenes Molekül als auch an Proteaseinhibitoren gebunden (63, 129). Das freie PSA (fPSA) stellt mit etwa 10-30% des Gesamt-PSA oder auch totalen PSA (tPSA) die kleinere Fraktion des PSA im Serum. Der weitaus größere Teil des PSA ist an Proteaseinhibitoren gebunden. Hierzu zählen das α -1-Antichymotrypsin (ACT-PSA), α -2-Makroglobulin (A2-M-PSA), α -1-Antitrypsin (API-PSA), Inter- α -Trypsin-Inhibitor (ITI-PSA) sowie das Protein-C-Inhibitor (PCI-PSA). Der PCI-PSA-Komplex konnte bisher nur im Seminalplasma nachgewiesen werden (62).

Als tPSA wird die Summe aus fPSA, ACT-PSA und API-PSA bezeichnet. Die Summe aus ACT-PSA und API-PSA ergibt das komplexierte PSA (cPSA) (2).

Die physiologisch bedeutsame Funktion des PSA besteht in der Verflüssigung des Samens nach der Ejakulation durch Proteolyse der gelbildenden Proteine Fibronectin sowie Semenogelin I und II (61). Dadurch wird die Spermienmotilität als wichtiger Faktor der Fertilität unterstützt. Möglicherweise liefert das PSA auch einen Beitrag zur Regulation der Angiogenese, Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Modifikation der extrazellulären Matrix (79). Wirkungen auf das Parathormon sollen bestehen, die Angiogenese kann gehemmt werden und es besteht eine Interaktion mit Antithrombin, welches in der Prostata produziert wird und eine starke antiangiogenetische Aktivität besitzt (12).

Das Wissen über die möglichen physiologischen Funktionen des PSA ist derzeit noch begrenzt und bedarf weiterer Forschung.

1.2.2 Einflussfaktoren auf PSA und freies PSA im Serum

Seit seiner Entdeckung vor mehr als 25 Jahren hat sich das PSA zum bedeutendsten Marker für Früherkennung, Therapie und Verlauf des PCa entwickelt (98). In den frühen 1990er Jahren wurde in umfangreichen Studien gezeigt, dass die alleinige Bestimmung des tPSA besser als die DRU oder andere Parameter zur Detektion eines PCa geeignet ist (10, 19, 51). Die Kombination aus tPSA und DRU war zur damaligen Zeit der erfolgreichste Weg zur Prostatakarzinomerkennung. So wiesen Catalona et al. (19) in einer Multicenterstudie an 6630 Männern nach, dass der positive prädiktive Wert einer tPSA-Bestimmung von etwa 10% bei Patienten mit tPSA-Konzentrationen $<4 \mu\text{g/L}$ auf über 80% bei einem tPSA-Wert $>20 \mu\text{g/L}$ anstieg. Im tPSA-Bereich von $4\text{-}10 \mu\text{g/L}$ wurde bei den meisten Patienten mit einem PCa ein nichtorganüberschreitendes Tumorstadium diagnostiziert, während bei über 50% der Patienten mit PSA-Werten $>10 \mu\text{g/L}$ ein PCa im fortgeschrittenen, organüberschreitenden Krankheitsstadium festgestellt wurde (19). Diese Untersuchungen machten aber auch gleichzeitig die begrenzte Aussagekraft des PSA als Marker eines PCa deutlich. Der allgemein akzeptierte tPSA-Grenzwert von $4 \mu\text{g/L}$ führt zu einer hohen Rate von 65% falsch-positiven Ergebnissen. Ungefähr 20% der Patienten mit einem histologisch gesicherten PCa weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen „unauffälligen“ tPSA-Wert von $<4 \mu\text{g/L}$ auf, gleichbedeutend der falsch-negativen Rate des tPSA (7, 22). Diese Darlegungen spiegeln deutlich das begrenzte Vermögen der alleinigen tPSA-Bestimmung zur Unterscheidung zwischen PCa und anderen benignen Erkrankungen wider (7, 133). Begründet wird dieser Umstand durch die weitgehende Organ- jedoch fehlende Karzinomspezifität des PSA. Die sichere Interpretation erhöhter PSA-Werte wird zusätzlich erschwert durch die Mengenunterschiede von BPH-Gewebe in der Prostata (124) sowie Variationen des Epithel-zu-Stroma-Verhältnisses (94).

Die Höhe des Serum-tPSA-Wertes unterliegt zeitweise starken Schwankungen, z.B. verursacht durch medikamentöse Therapie, nichttumoröse Prostataerkrankungen oder urologische diagnostische /therapeutische Maßnahmen.

Dieses wird im Folgenden näher erläutert.

Während der Alphablocker Terazosin den tPSA-Wert im Serum nicht beeinflusst (110), kommt es im Gegensatz dazu unter Einnahme von Finasterid nach 6 Monaten zu einem Absenken des tPSA-Wertes im Serum um ca. 50% (32, 88). Pannek berichtet über gleich bleibende Anteile des freien PSA im Serum bei gleichzeitiger Reduktion des

tPSA-Wertes im Serum sowie der PSA-Dichte unter Therapie mit Finasterid (88). Für klinische Belange hat sich folgendes Vorgehen durchgesetzt: den korrigierten „wahren“ Serum-tPSA-Wert eines Patienten nach wenigstens 6 monatiger Finasterideinnahme erhält man durch Multiplikation des vorliegenden Serum-tPSA-Wertes mit dem Faktor 2 (85). Im Gefolge einer akuten oder subklinischen Prostatitis oder nach akutem Harnverhalt können erhöhte Serum-tPSA-Werte unterschiedlichen Ausmaßes diagnostiziert werden (81). Die Halbwertszeit des PSA beträgt 2,2 bis 3,2 Tage, die Zeitdauer bis zum Wiedererreichen eines individuellen Basiswertes ist abhängig von Art und Dauer des ursächlichen Ereignisses, welches zum Anstieg des PSA-Wertes führte (125). Nach einer akuten Prostatitis geht man von 6-8 Wochen aus, bis der Serum-tPSA-Wert wieder in Normbereiche fällt (103). Nadler et al. (81) zeigten an einer Studie an 148 Männern mit einem Serum-tPSA-Wert $>4 \mu\text{g/L}$, dass die subklinische Prostatitis signifikant häufiger mit erhöhten tPSA-Werten einhergeht.

Die Durchführung der transrektalen Ultraschalluntersuchung, die Routine-Urethrozystoskopie oder auch die Anlage eines transurethralen Dauerkatheters haben keinen Einfluss auf die Höhe des Serum-tPSA-Wertes (84). Nach einer Prostatastanzbiopsie steigen die Serum-tPSA-Werte im Durchschnitt auf $7,9 \mu\text{g/L}$ (84). Nach erfolgter Prostatastanzbiopsie dauert es ca. 14-17 Tage, bis das Serum-tPSA wieder in Normbereiche gesunken ist. Einige Patienten weisen jedoch noch einen Monat nach dieser diagnostischen Maßnahme erhöhte Werte auf (84).

Mit der Bestimmung eines tPSA-Wertes im Serum, der die Grundlage klinischer Entscheidungen im Rahmen weiterer Diagnostik und Therapie des Patienten darstellt, sollte daher nach einer akuten Prostatitis oder Prostatastanzbiopsie mindestens 4-6 Wochen gewartet werden (103). Die laborchemische Auswirkung von Manipulationen, die vorwiegend die Höhe des freien PSA im Serum betreffen, sind in Bezug auf den klinischen Gebrauch durch dessen relativ kurze Halbwertszeit von <2 Stunden gekennzeichnet. Auch der Einfluss der Ejakulation auf die Höhe des Serum-tPSA- und fPSA-Wertes sowie auf die Höhe des freien PSA (fPSA) wurde untersucht. Zwei Studien an Männern >50 Jahre ergaben einen signifikanten Anstieg des Serum-tPSA-Wertes 1 Stunde nach Ejakulation (37, 141). Bei Männern unter 30 Jahren führte die Ejakulation jedoch nur zu marginalen Veränderungen des tPSA-Wertes (49). Im individuellen Fall kann jedoch auch mehrere Stunden nach Ejakulation eine deutliche PSA-Erhöhung nachweisbar sein, so dass eine sexuelle Karenz von mindestens 2 Tagen vor der PSA-Messung empfohlen wird (70).

In der Zusammenschau existiert eine Vielzahl an äußeren Einflüssen, die eine korrekte Interpretation des tPSA-Wertes schwierig, in manchen Fällen unmöglich macht. Das oft synchrone Auftreten von BPH und Prostatitis oder auch PCa, verbunden mit der eingangs erwähnten relativ hohen Rate falsch-positiver bzw. falsch-negativer PSA-Werte im Serum sowie die insgesamt eingeschränkte Diskriminationsfähigkeit des tPSA führten zur Entwicklung der nun nachfolgend dargestellten Konzepte.

1.3 Verbesserung der PSA-Aussagekraft

1.3.1 PSA-Anstiegsgeschwindigkeit

Carter und Mitarbeiter (14) untersuchten erstmals das Ausmaß von PSA-Serumspiegelveränderungen über einen definierten Zeitraum. Dieses 1992 vorgestellte Konzept basiert auf der Messung von 3 tPSA-Serumspiegeln innerhalb eines Zeitraumes von 2 Jahren und wird als PSA-Anstiegsgeschwindigkeit bezeichnet (14). Sie wird wie folgt berechnet: $\frac{2.\text{PSA-Wert} - 1.\text{PSA-Wert}}{\text{Zeitintervall zwischen Bestimmung 1 und 2}} + \frac{3.\text{PSA-Wert} - 2.\text{PSA-Wert}}{\text{Zeitintervall zwischen Bestimmung 2 und 3}}$. Bei den 54 Patienten, die im Rahmen der "Baltimore longitudinal study of aging" über 17 Jahre untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit zwischen BPH-Patienten und Männern mit einem PCa bis zu 9 Jahre vor der Diagnosesicherung des PCa erkennbar waren (14). Bei einem Grenzwert von $0,75 \mu\text{g/L/Jahr}$ erwies sich die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit suffizienter als die alleinige PSA-Serumspiegelbestimmung bei einer Sensitivität von 72% und einer Spezifität von 95% (14). Smith und Catalona (121) führten eine prospektive PSA-basierte Screeningstudie an 982 Männern durch. Bei Männern mit einem tPSA $\leq 4 \mu\text{g/L}$ in einem Alter von ≤ 70 Jahren erbrachte eine Anstiegsgeschwindigkeit von mindestens $0,75 \mu\text{g/L/Jahr}$ in dieser Studie die maximale Spezifität und Sensitivität bezüglich der Erkennung eines PCa (121). Ciatto und Mitarbeiter (25) beobachteten den PSA-Verlauf bei 1666 Männern im Alter von 55-74 Jahren über einen Zeitraum von 4 Jahren. Eine PSA-Anstiegsgeschwindigkeit von $0,75 \mu\text{g/L/Jahr}$ zeigte hier eine Spezifität von 97% bei einer Sensitivität von nur 55% in Bezug auf PCa-Detektion. Eine Reduktion der PSA-Anstiegs-

geschwindigkeit auf 0,1 µg/L/Jahr ging hier in begrenztem Umfang mit der Vermeidung unnötiger Biopsien einher (25).

Die Grenzen der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit sind bedingt durch die Art ihrer Berechnung. Ausserdem unterliegt der PSA-Messwert im Verlaufe des geforderten 2-Jahreszeitraumes sowie auch individuell stärkeren biologischen Schwankungen bis zu 20% (122). Der klinische Einsatz dieses Parameters wird zusätzlich erschwert durch die Notwendigkeit der durchgehenden Benutzung nur eines PSA-Testsystems, um die Ergebnisse wirklich vergleichen zu können. Die Messergebnisse verschiedener Testsysteme in identischen Serumproben können stark variieren.

Ob die Bestimmung der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit im Vergleich zum alleinigen PSA-Serumspiegel den positiven prädiktiven Wert für die Früherkennung des PCa erhöht, wird derzeit hochaktuell diskutiert (113). Während einige Studien einen klaren Nutzen für die PCa-Erkennung aufzeigen können (9, 28), sind die Ergebnisse anderer Studien mit sehr großen Patientenzahlen sehr zurückhaltend bezüglich des Nutzens der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit im Vergleich zum PSA allein (114, 143). Eine Absenkung des Grenzwertes der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit von 0,75 auf 0,4 µg/L/Jahr erscheint jedoch vor allem für jüngere Patienten sinnvoll, um eine ausreichende Sensitivität beizubehalten (67).

Die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit eignet sich letztendlich mehr zur Verlaufsbeobachtung bei Patienten, die regelmäßig zur urologischen Vorsorge kommen als zur alleinigen Entscheidungshilfe bei Patienten mit klinischem Verdacht auf ein PCa (87, 103).

1.3.2 PSA-Verdopplungszeit

Die PSA-Verdopplungszeit (PSADT=PSA-double-time) basiert auf der nachfolgend dargestellten Formel und ergibt eine Zeitangabe: $PSADT = \log(2) \times \text{Zeit} / \log \frac{2 \cdot PSA - \log 1 \cdot PSA}{1 \cdot PSA}$. Die PSADT ist damit sowohl von der Höhe des Ausgangs-PSA-Wertes als auch vom gewählten PSA-Testverfahren unabhängig (112).

Eine verbesserte Unterscheidung zwischen PCa und BPH gelingt mit der PSADT jedoch nicht (35). In der Praxis wird die PSA-Verdopplungszeit eher bei Patienten im fortgeschrittenen hormonrefraktären Stadium als bei der Diagnostik des PCa benutzt.

1.3.3 PSA im Urin

Das PSA wird in seiner unveränderten Form nicht signifikant renal eliminiert (117). PSA-Werte, die im Urin gemessen werden, stammen daher aus der Prostata. Auf Grund dieser Tatsache wurde der Nutzen der PSA-Bestimmung im Urin für die Früherkennung des PCa in mehreren Studien mit z.T. gegensätzlichen Ergebnissen untersucht.

In einer Studiengruppe konnten signifikant unterschiedliche Urin-PSA-Werte bei Patienten mit BPH und PCa ermittelt werden (146). Auch konnte ein Quotient aus Serum- und Urin-PSA für die Detektion des PCa beschrieben werden (40). In einer weiteren Studie waren weder der Quotient aus Serum- und Urin-PSA noch die Bestimmung molekularer Formen des PSA sowie das KLK2 im Urin in der Lage, die Detektion des PCa zu verbessern (90).

Auf Grund von Problemen bei der Probensammlung und -verarbeitung und der erheblichen Schwankungsbreite des Urin-PSA-Wertes ist dieser Parameter kein Bestandteil der klinischen Routine.

1.3.4 PSA-Dichte

Der Umstand, dass Prostatakarzinomzellen, verglichen mit dem identischen Volumen an benignen Prostatazellen, einen 10 mal höheren PSA-Serumspiegel verursachen, führte zur Untersuchung des PSA-Serumspiegels in Relation zur Prostatagröße (8, 125). Der Quotient aus dem tPSA-Serumspiegel ($\mu\text{g/L}$) und dem Prostatavolumen, ermittelt durch transrektalen Ultraschall (TRUS) in ml, wird als PSA-Prostatavolumenquotient bzw. PSA-Dichte definiert (103). Die PSA-Dichte oder auch „PSA-Density“ wurde 1992 in den klinischen Sprachgebrauch eingeführt (8). Der Grenzwert von 0,15 wurde 1993 als nutzbringend zur PCa-Detektion bei moderat erhöhtem Serum-tPSA von 4-10 $\mu\text{g/L}$ beschrieben (116). Eine Vielzahl von anschließenden Studien ergaben aber z.T. widersprüchliche Resultate. Einige Autoren bestätigten den Wert der PSA-Dichte-Bestimmung (118, 150). Im Gegensatz dazu ergab eine große Multicenterstudie von Catalona et al. (20), dass bei der alleinigen Verwendung der Prostatadichte mit einem Grenzwert von 0,15 fast 50% der Patienten mit einem PCa nicht entdeckt worden wären. Zudem ist der Grenzwert von 0,15 lediglich mit einer Sensitivität von 58% und einer Spezifität von 51% behaftet, beides Werte, die einen sinnvollen klinischen Einsatz dieses Parameters limitieren (145). Eine Studie an mehr als 1800 Patienten zeigte, dass eine

Anpassung des Grenzwertes in Abhängigkeit vom tPSA sinnvoll ist, wobei die PSA-Dichte insbesondere im niedrigen tPSA-Bereich von 2-4 µg/L eine deutliche Verbesserung zum PSA zeigte (138).

Die offensichtlichen Unterschiede zwischen den genannten Studien könnten verschiedene Ursachen haben.

Die Grenzen der PSA-Dichte-Bestimmung bestehen in ihrer Abhängigkeit vom Untersucher und von einer exakten Prostatavolumenbestimmung mittels TRUS (145). Bereits geringe Messungenauigkeiten im Millimeterbereich bei der Ermittlung der Prostata Durchmesser im TRUS können zu erheblichen Fehleinschätzungen des Prostatavolumens führen. Zusätzlich korreliert das ermittelte Drüsenvolumen nicht zwingend mit dem Serum-tPSA-Wert, da die Epithel-zu-Stroma-Relation interindividuell schwankt und nur das Epithel der Prostata zur PSA-Produktion fähig ist (126).

Die Hoffnung, mit der Berechnung der PSA-Dichte eine Hilfe zur Entscheidung für oder gegen eine Prostatastanziopsie in der sogenannten „Grauzone“ der PCa-Detektion bei tPSA-Serumwerten zwischen 4-10 µg/L zu erhalten, erfüllte sich damit nicht.

1.3.5 PSA-Dichte der Transitionalzone

Der Quotient aus tPSA-Serumwert in µg/L und dem Volumen der Transitionalzone in ml, ermittelt im TRUS, war ein weiterer Versuch, die Spezifität der PCa-Detektion zu verbessern. Das Konzept der PSA-Dichtebestimmung der Transitionalzone beruht auf der Tatsache, dass die BPH histologisch nahezu ausschließlich in der Transitionalzone der Prostata lokalisiert ist. Das übrige prostatistische Gewebe enthält nur geringe BPH-Anteile und ist für die PSA-Produktion, die nur vom Epithel der Drüsenanteile der Prostata ausgeht, zu vernachlässigen (48, 160).

Wie bereits bei der PSA-Dichte der gesamten Drüse bekannt, unterliegt auch die transrektale Größenbestimmung der Transitionalzone starken geräte- und untersucherabhängigen Schwankungen. Die sich daraus ergebende fehlende Reproduzierbarkeit der Befunde lässt zzt. sowohl das Konzept der PSA-Dichte der gesamten Drüse als auch die PSA-Dichte bezogen auf die Transitionalzone als nicht geeignet für Vorsorgeuntersuchungen oder andere klinische Routineuntersuchungen in der Urologie erscheinen.

1.3.6 Altersspezifische Referenzgrenzen des PSA

Auf Grund der altersabhängigen Zunahme des BPH-Gewebes steigt mit zunehmendem Alter auch der PSA-Wert. In einer prospektiven Studie an 2119 gesunden Probanden fand sich eine direkte Korrelation zwischen dem PSA-Serumspiegel und Alter sowie Prostatavolumen (83). Die Ergebnisse dieser Studie führten zur Festlegung altersspezifischer PSA-Referenzwerte. Das Ziel bestand in der Erhöhung der Sensitivität in der Prostatakarzinomerkenung jüngerer Patienten mit eher organbegrenzten Karzinomen, die von einer lokalen Therapie profitieren sowie in einer gesteigerten Spezifität in der älteren Patientengruppe, bei denen möglicherweise lediglich ein nicht therapiebedürftiges klinisch insignifikantes PCa diagnostiziert wird. Bis zum 50. Lebensjahr liegen die ermittelten Werte zwischen 0-2,5 µg/L mit einer Steigerung auf 0-6,5 µg/L für Patienten >70 Jahre (83).

In einer Reihe an Studien wurde die Wertigkeit altersabhängiger PSA-Referenzwerte im Vergleich zum Standard-tPSA-Wert überprüft. An einer Gruppe von 1716 Männern im Alter von 40-79 Jahren konnte gezeigt werden, dass die o. a. altersspezifischen PSA-Werte für Patienten <60 Jahren zu hoch sowie für Patienten >70 Jahren zu niedrig sind (3). Partin et al. (96) zeigten, dass durch den Gebrauch altersspezifischer PSA-Werte bei Patienten bis 60 Jahre 74 zusätzliche PCa aus einer Summe von 4600 Patienten mit einem organbegrenzten Tumor diagnostiziert worden wären. Die Karzinomerkenungsrate würde sich in der jüngeren Patientengruppe um 18% erhöhen, während sie jedoch in der Gruppe älterer Patienten um 22% abnähme.

In einer Studie an 21079 Männern in Tirol wurden im Rahmen einer Prostata-screeninguntersuchung die Anzahl der Biopsien sowie die Anzahl diagnostizierter Karzinome unter Verwendung altersspezifischer PSA-Werte als auch des Standard-Grenzwertes von 4 µg/L untersucht (104). In der Altersgruppe jünger als 59 Jahre wurden durch den Gebrauch altersspezifischer PSA-Werte bei unauffälliger DRU 8% mehr Karzinome entdeckt. In der Altersgruppe >60 Jahre konnten damit 21% der Biopsien eingespart werden, 8% der organbegrenzten Tumore wurden übersehen.

Andere Autoren favorisieren den Gebrauch des bisherigen Standard-PSA-Grenzwertes von 4 µg/L als weiterhin effektivsten und kostengünstigsten Grenzwert für alle Altersgruppen (20, 66). Ein niedrigerer PSA-Grenzwert bei jüngeren Männern zieht demnach zusätzliche negative und damit unnötige und kostenverursachende Biopsien nach sich. Bei Patienten >60 Jahren können Biopsien eingespart werden, mit der Ein-

schränkung, Karzinome zu übersehen. Neuere Daten zeigen jedoch, dass auch bei PSA-Werten $<4 \mu\text{g/L}$ eine erhebliche Anzahl an PCa übersehen werden kann (1, 144). So betrug die PCa-Prävalenz 15% in einer Screeningpopulation, wo ca. 3000 Patienten nach 7 Jahren Beobachtung eine Prostatastanziobiopsie erhielten. In den PSA-Bereichen 2-3 und 3-4 $\mu\text{g/L}$ war die Prävalenz mit 24% und 27% vergleichbar mit der Prävalenz des PCa im PSA-Bereich 4-10 $\mu\text{g/L}$ anderer Studien (144). In einer Zuweisungsgruppe ergab sich mit 23% eine noch höhere PCa-Detektionsrate im PSA-Bereich $<4 \mu\text{g/L}$ (1). Somit gibt es aktuell keinen wirklich relevanten PSA-Grenzwert, mit Hilfe dessen das Vorhandensein eines PCa ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass altersspezifische PSA-Werte in der Diagnostik des PCa einen Spezifitätsgewinn bei Jüngeren unter Abnahme der Sensitivität bei Älteren erzielen. In der klinischen Praxis sollten sie mit Bedacht angewandt werden. Ihre Verwendung ist weder von der FDA genehmigt noch wird sie von den Herstellern kommerzieller PSA-Assays empfohlen (103).

Die hier vorgestellten Konzepte der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit, PSA-Verdopplungszeit, PSA im Urin, PSA-Dichte, PSA-Dichte der Transitionalzone sowie der altersspezifischen Referenzgrenzen wurden entwickelt, um die Rate der falsch-positiven und falsch-negativen Befunde eines PCa auf der Basis der tPSA-Bestimmung im Bereich zwischen 4-10 $\mu\text{g/L}$ zu reduzieren. Die Erwartung, dass diese Verfahren unter Zuhilfenahme weiterer Variablen die Aussagekraft des tPSA-Wertes signifikant erhöhen, hat sich jedoch nur teilweise erfüllt.

2 Aufgabenstellung

Das PSA ist der am weitesten verbreitetste und in der urologischen Onkologie gebräuchlichste Tumormarker. Wegen des großen Nachteils des PSA mit Mangel an Spezifität besteht ein großer Überlappungsbereich mit anderen benignen Erkrankungen der Prostata wie BPH oder Prostatitis, welche ebenfalls zur Erhöhung des PSA beitragen können. Ursächlich dafür sind aber auch medikamentöse Behandlungen oder Routineuntersuchungen in der Urologie, die eine korrekte Bewertung des PSA in der täglichen Praxis erschweren.

Mit der Entdeckung des freien PSA bzw. des Quotienten fPSA/tPSA (fPSA) konnte die Spezifität der PCa-Früherkennung des PSA im genannten tPSA-Bereich um ca. 20% gesteigert werden (18).

In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung auf die Identifikation der verschiedenen Isoformen des freien PSA. Bekannt sind hier das so genannte „benigne PSA“ oder auch bPSA, das intakte fPSA (fPSA_i) sowie zahlreiche proPSA-Formen (102). Erstmals 1997 wurde im Serum von PCa-Patienten eine proPSA-Isoform als (-4)proPSA durch Mikolajczyk et al. beschrieben (73). Ein deutlich erhöhter Anteil der Isoformen (-2)proPSA und (-4)proPSA konnte im PCa-Gewebe nach Prostatektomie im Vergleich zu BPH-Gewebe ebenfalls durch Mikolajczyk et al. im Jahre 2000 nachgewiesen werden (77). Auch in der Untersuchung von Serumanalysen von PCa-Patienten zeigte sich in einer Studie von 2001 ein deutlich höherer Anteil der (-2)proPSA-Isoform am freien PSA als im Serum von BPH-Patienten (74). Peter et al. (100) gelingt 2001 die umfassende immunhistochemische Beschreibung der zzt. bekannten proPSA-Isoformen im Serum und Prostatagewebe. Diese entstehen nach Abspaltung mittels Serinproteasen vom intakten freien PSA-Molekül und besitzen das komplette Propeptid von 7 Aminosäuren (-7)proPSA und gekürzte Propeptidsequenzen von 1 (-1)proPSA, 2 (-2)proPSA, 4 (-4)proPSA und 5 (-5)proPSA. In weiteren Untersuchungen zeigte die (-2)proPSA-Isoform einen engen Zusammenhang mit dem Auftreten vor allem aggressiver PCa-Formen (15, 16). Das (-5,-7)proPSA zeigte in einer Studie mit relativ geringer Patientenzahl zwar die Fähigkeit, zwischen PCa und BPH zu unterscheiden, es konnte aber nicht zwischen G1-, G2- und G3-Tumoren differenzieren (6). Eine Analyse bezüglich des pathologischen Tumorstadiums oder anhand des Gleason-Score erfolgte in dieser Studie aller-

dings nicht (6). Somit war eine endgültige Bewertung dieses Tumormarkers noch nicht erfolgt.

Die vorliegende Arbeit diene der Bestimmung der präoperativen diagnostischen Wertigkeit des (-5,-7)proPSA und seiner Quotienten zum tPSA und fPSA an einer größeren Patientenzahl mit folgenden Zielen:

- 1.) Vorhersage des endgültigen pathologischen Stadiums des PCa,
- 2.) Differenzierung zwischen G1-, G2- und G3-PCa,
- 3.) Differenzierung zwischen Gleason-Score <7 und Gleason-Score ≥ 7 ,
- 4.) Beziehung des (-5,-7)proPSA zum PSA, fPSA und %fPSA,
- 5.) Bedeutung des (-5,-7)proPSA bei besonders karzinomsuspekten Patienten (bei %fPSA $<10\%$).

Die Zielstellung dieser vorliegenden Arbeit war es, anhand einer größeren Patientengruppe die oben genannten Fragestellungen umfassend zu beantworten.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchte Probanden

3.1.1 Karzinompatienten

Insgesamt wurden Daten von 376 Patienten ausgewertet, welche im Zeitraum zwischen 2001 und 2004 in der Urologischen Klinik der Charité - Universitätsmedizin Berlin (Charité Campus Mitte) wegen eines PCa operativ behandelt wurden. Alle Patienten erhielten eine laparoskopische Prostatektomie, die prätherapeutische tPSA-Konzentration lag zwischen 1-25 µg/L. Die histopathologische Diagnose erfolgte durch mikroskopische Untersuchung der Prostatapräparate. Das Tumorstadium wurde entsprechend dem TNM-System von 2002 festgelegt. Nur Patienten im nicht-metastasierten Krankheitsstadium wurden analysiert (N0, M0).

Die Verteilung der Patienten auf die pathologischen Stadien pT ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Aufteilung der Patienten nach pathologischem Stadium pT

Tumor-stadium	pT2a/pT2b	pT2c	pT3a	pT3b	pT4
Patienten-anzahl	167	103	85	20	1

Somit ergibt sich für die Tumorstadien pT2a-pT2c eine Gesamtzahl von n=270 Patienten und für die fortgeschrittenen Tumorstadien pT3a-pT4 eine Patientenzahl von n=106.

Die Verteilung der Patienten bezüglich des Tumorgradings G ist in Tabelle 2 ersichtlich. Dabei haben mehr als 2/3 der PCa-Patienten ein Tumorgrading G1 und G2 (n=256) und 120 Patienten einen G3-Tumor.

Tabelle 2: Aufteilung der Patienten nach Tumorgrading G

Grading	G 1	G 2	G 3
Patientenanzahl	7	249	120

Insgesamt haben 151 Patienten einen Gleason-Score <7 und 225 Patienten einen Gleason-Score ≥ 7 . Im Folgenden ist die Verteilung der Patienten nach dem Gleason-Score in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Aufteilung der Patienten nach Gleason-Score

Gleason-Score	3	4	5	6	7	8	9	10
Patientenanzahl	1	6	50	94	155	40	28	2

Eine diagnostische pelvine Lymphknotendissektion erfolgte bei 190 der 376 PCa-Patienten, jedoch nicht bei den verbleibenden 186 Patienten mit einem niedrigen Risiko für Lymphknotenbefall. Der Lymphknotenstatus war somit pN0 bei 190 Patienten und Nx bei 186 Patienten. Kein Patient hatte einen tumorpositiven Befund der Lymphknoten.

3.2 PSA-Bestimmungen

3.2.1 Bestimmung von tPSA

Alle Blutproben wurden vor jeglicher diagnostischer oder therapeutischer Maßnahme der Prostata bzw. mindestens 4 Wochen nach jeglicher Manipulation an der Prostata abgenommen. Die Blutproben wurden bei -80°C aufbewahrt und retrospektiv analysiert.

Das Gesamt-PSA wurde mit dem ElektroChemiLumineszenzImmunoAssay „ECLIA“-total PSA ELECSYS[®] der Firma Roche (Roche Diagnostics, Mannheim,

Deutschland) am Roche Immunoassay Analyseautomaten ELECSYS® 2010 Analyzer bestimmt. Dieser immunologische in vitro Test dient der quantitativen Bestimmung des Gesamt-PSA in Humanserum oder Plasma. Der Test funktioniert nach dem Sandwichprinzip unter Verwendung monoklonaler anti-PSA-Antikörper der Maus. Zunächst bilden 20 µl der Serumprobe, ein biotinylierter monoklonaler PSA-spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter monoklonaler PSA-spezifischer Antikörper einen Sandwich-Komplex. Nach Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird der Komplex über Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an die Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Danach werden die ungebundenen Substanzen mit ProCell entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Ergebnisse werden dann anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Die analytische Nachweisgrenze des ELECSYS® 2010 beträgt für tPSA 0,002 µg/L.

3.2.2 Bestimmung von fPSA

Die Bestimmung des freien PSA in Humanserum und -plasma erfolgt entsprechend dem immunologischen Testverfahren, welches für das tPSA beschrieben ist. Die Ergebnisse beider Tests sind die Grundlage der Berechnung des %fPSA. Gemessen mit dem ELECSYS® 2010 liegt die analytische Nachweisgrenze des fPSA bei 0,01 µg/L. Um medizinische Fehlinterpretationen zu vermeiden, müssen tPSA- und fPSA-Werte immer mit dem gleichen Testverfahren ermittelt werden.

3.2.3 Bestimmung von (-5,-7)proPSA

Die Bestimmung des proPSA erfolgte durch einen neu entwickelten immunologischen Prototyp-Assay, der speziell die (-5,-7)proPSA-Formen messtechnisch erfasst (38). Ein Heptapeptid, das aus 6 Aminosäuren des proPSA-Teiles und der N-terminalen Aminosäure (Isoleucin) des PSA besteht, wurde zur Erzeugung von Mausantikörpern genutzt. Auf diese Weise entstand ein monoklonaler Antikörper zur spezifischen Erfassung der (-7, -6 und -5)proPSA-Formen, wobei die (-6)proPSA-Form bisher nicht nachgewiesen wurde. Der biotinylierte Anti(-7,-6,-5)proPSA-Antikörper ersetzt den biotinylierten Antikörper des F-PSA-Enzymun-Testes und kann dann zur Messung dieser speziellen pro-

PSA-Formen bei PCa und BPH auch bei geringen Mengen von fPSA eingesetzt werden. Im Rahmen der Studie wurde die analytische Genauigkeit des (-5,-7)proPSA Tests evaluiert. Die intra-und inter-Assay Präzision wurde anhand von Kontrollmaterial und gepoolten Serumproben bestimmt. Die Variationskoeffizienten bei 40 Messungen von 2 gepoolten Serumproben waren 7.2% (proPSA 1.31 µg/L) und 13.1% (proPSA 0.16 µg/L). Die analytische Nachweisgrenze des (-5,-7)proPSA, gemessen mit dem ELECSYS® 2010, beträgt 0,008 µg/L.

3.3 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit den Programmen SPSS 12.0 für Windows (SPSS, Chicago, USA) und GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Der Mann-Whitney *U*-Test und der Spearman'sche Korrelationskoeffizient r_s wurden verwendet. Logistische Regressionsanalysen wurden durchgeführt mit vorwärts und rückwärts schrittweiser Analyse unter Gebrauch der Variablen tPSA, %fPSA, proPSA, proPSA/tPSA und proPSA/%fPSA. Die diagnostische Genauigkeit wurde mit der receiver operating characteristic (ROC)-Kurvenanalyse durchgeführt. Es erfolgte die Berechnung der Fläche unter der ROC-Kurve (area under the curve: AUC) und der Spezifität bei 95% Sensitivität unter Gebrauch des Programmes GraphROC 2.1 für Windows (47) und MedCalc 8.1.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgien). Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Beziehung zwischen tPSA und pT, Grading und Gleason-Score

In Tabelle 4 sind für die jeweiligen Patientengruppen pT2 (n=270), pT3 (n=106) sowie G2 (n=256), G3 (n=120) als auch Gleason-Score <7 und ≥ 7 die Signifikanzen innerhalb der 3 tPSA-Bereiche und innerhalb aller Patienten mit einem %fPSA $<10\%$ dargestellt.

Tabelle 4: Signifikanzen zwischen pT2/3, Grading 2/3 sowie Gleason-Score <7 und ≥ 7 für 3 tPSA-Bereiche bzw. %fPSA $\leq 10\%$

	1-10 tPSA	4-10 tPSA	1-25 tPSA	$\leq 10\%$ fPSA
Patienten-				
gruppe				
	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz
tPSA				
pT2 vs. pT3	0,558	0,602	0,008	0,054
G2 vs. G3	0,735	0,844	0,014	0,209
Gleason-Score				
<7 vs. ≥ 7	0,302	0,782	0,004	0,180

In der Gruppe aller Patienten (1-25 µg/L tPSA) sind die tPSA-Serumkonzentrationen in der pT3-Gruppe signifikant höher als in der pT2-Gruppe (p =0,008). In allen anderen tPSA-Untergruppen sowie bei %fPSA-Werten ≤10% kann tPSA nicht zwischen pT2 und pT3 differenzieren (p>0,05). In Abbildung 1 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt, signifikante Unterschiede im Median tPSA sind mittels grauer Schattierung hervorgehoben.

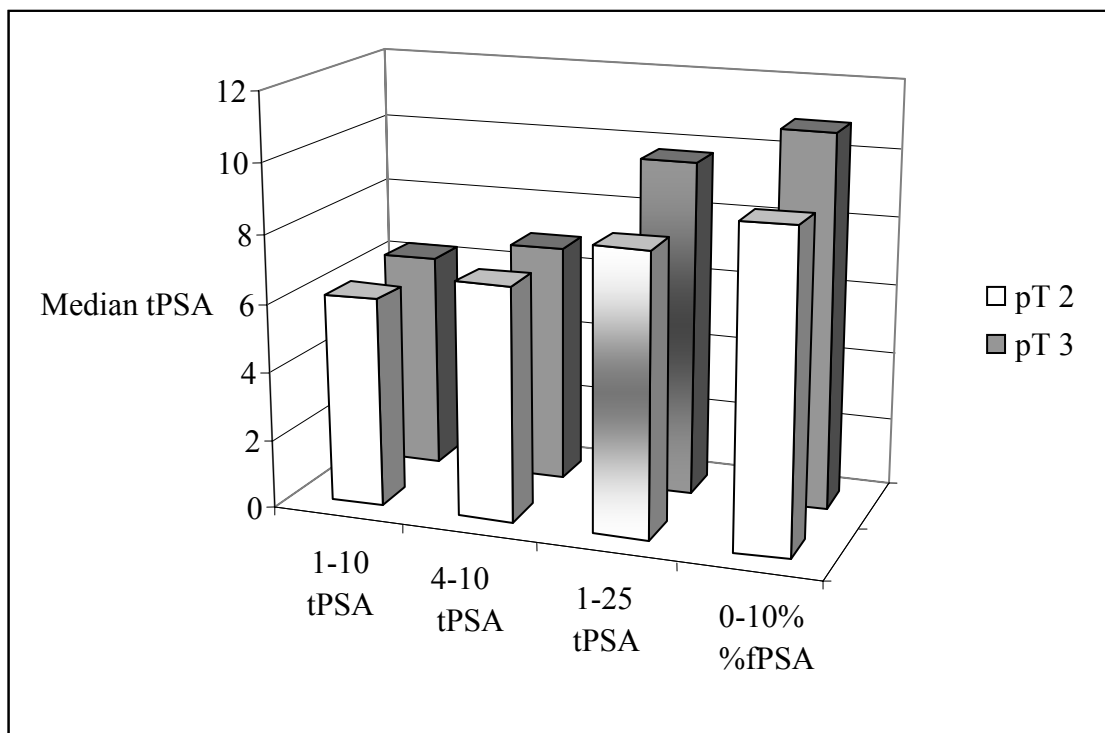


Abbildung 1: Median tPSA in Beziehung zum Tumorstadium pT in definierten tPSA-Bereichen (µg/L) und %fPSA ≤10%

In der Gruppe aller Patienten (1-25 µg/L tPSA) sind die tPSA-Serumkonzentrationen für G3 signifikant höher als bei G2-Tumoren (p=0,014). In allen anderen Untergruppen und bei %fPSA Werten ≤10% kann tPSA nicht zwischen G2- und G3-Tumoren differenzieren (p>0,05). In Abbildung 2 ist dieser Sachverhalt ebenfalls graphisch dargestellt.

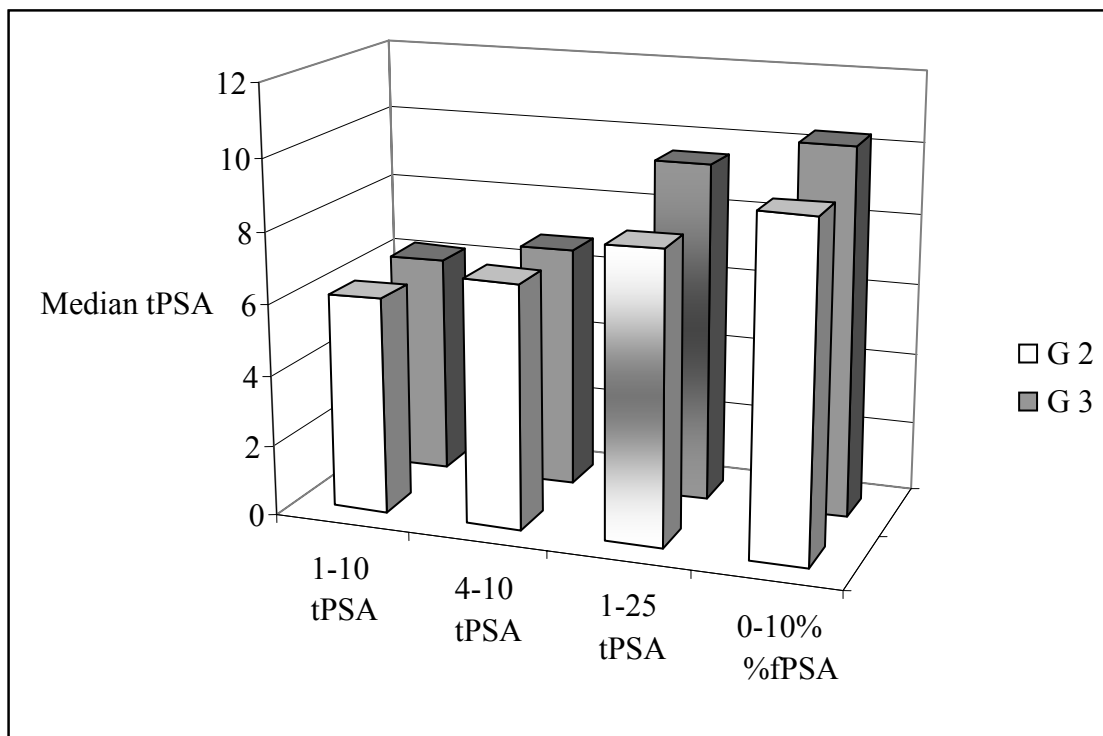


Abbildung 2: Median tPSA in Beziehung zum Grading G in definierten tPSA-Bereichen (µg/L) und %fPSA ≤10%

In der Gruppe aller Patienten (tPSA 1-25 $\mu\text{g/L}$ tPSA) besteht bezüglich der tPSA-Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen weniger aggressiven (Gleason-Score <7) und aggressiven Tumoren (Gleason-Score ≥ 7) ($p=0,004$). In allen anderen tPSA-Untergruppen einschließlich %fPSA $\leq 10\%$ ließ sich ein signifikanter Unterschied in den tPSA-Konzentrationen nicht nachweisen ($p>0,05$). In Abbildung 3 ist dieser Sachverhalt erneut dargestellt.

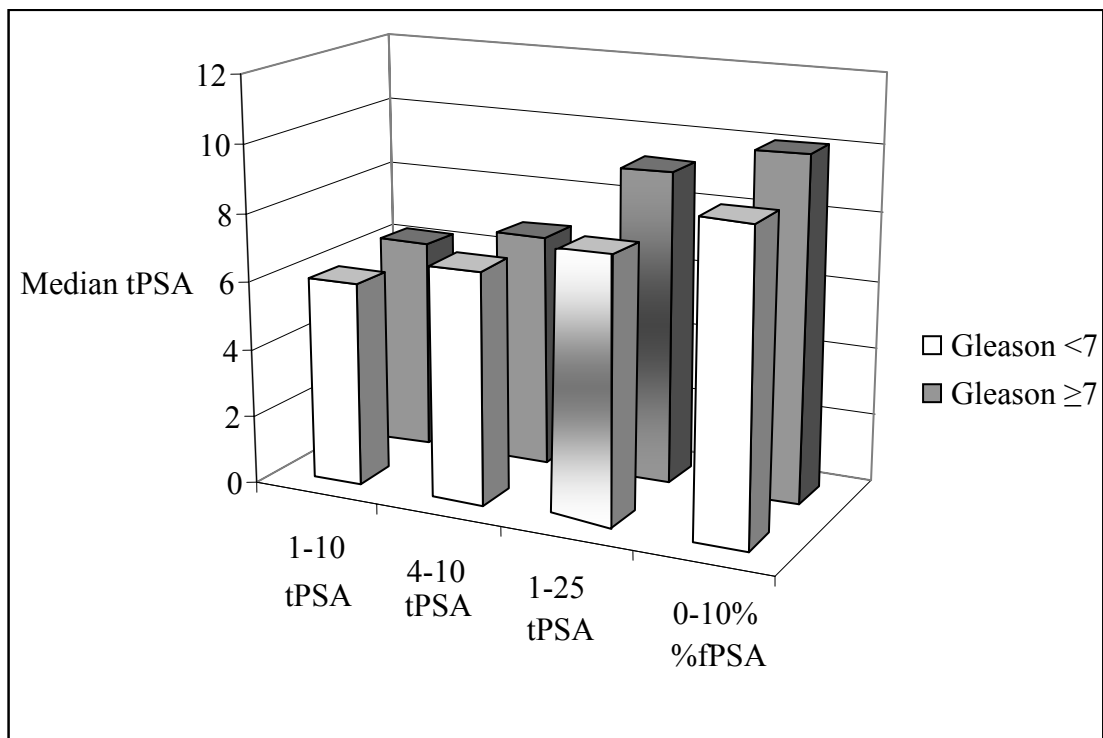


Abbildung 3: Median tPSA in Beziehung zum Gleason-Score in definierten tPSA-Bereichen ($\mu\text{g/L}$) und %fPSA $\leq 10\%$

4.2 Beziehung zwischen %fPSA und pT, Grading und Gleason-Score

In Tabelle 5 sind bezüglich des %fPSA die Signifikanzen zwischen den jeweiligen Patientengruppen pT2 und pT3, G2 und G3 sowie Gleason-Score <7 und ≥ 7 abgebildet.

Tabelle 5: Signifikanzen zwischen pT2/3, Grading 2/3 sowie Gleason-Score <7 und ≥ 7 für 3 tPSA-Bereiche bzw. %fPSA $\leq 10\%$

	1-10 tPSA	4-10 tPSA	1-25 tPSA	$\leq 10\%$ fPSA
Patienten-				
gruppe				
	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz
%fPSA				
pT2 vs. pT3	0,404	0,639	0,071	0,089
G2 vs. G3	0,591	0,450	0,456	0,723
Gleason-Score				
<7 vs. ≥ 7	0,033	0,013	0,021	0,277

In allen untersuchten tPSA-Untergruppen einschließlich %fPSA $\leq 10\%$ ließ sich im Hinblick auf die mediane %fPSA-Konzentration zwischen pT2- (fPSA: 11,45%, 11,02%, 10,99%, 7,13%) und pT3-Tumoren (%fPSA: 11,25%, 10,93%, 10,14%, 6,70%) kein signifikanter Unterschied nachweisen.

In allen untersuchten tPSA-Untergruppen einschl. %fPSA $< 10\%$ ließ sich im Hinblick auf die %fPSA-Konzentration ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen G1-2 (%fPSA: 11,37%, 11,09%, 10,81%, 7,03%) und G3-Tumoren (%fPSA: 11,50%, 10,76%, 10,64%, 6,95%) nachweisen.

Dahingegen zeigt der mediane %fPSA Wert signifikante Unterschiede zwischen aggressiven (Gleason-Score ≥ 7 , %fPSA: 10,99%, 10,37%, 10,39%) und weniger

aggressiven Tumoren (Gleason-Score <7 , %fPSA: 11,92%, 11,84%, 11,30%) in den tPSA-Bereichen 1-10, 4-10 und 1-25 $\mu\text{g/L}$ ($p=0,033$; $p=0,013$; $p=0,021$).

In der Untergruppe %fPSA $\leq 10\%$ ließ sich ein signifikanter Unterschied allerdings nicht nachweisen ($p=0,277$).

In Abbildung 4 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt, signifikante Unterschiede im Median %fPSA sind hervorgehoben.

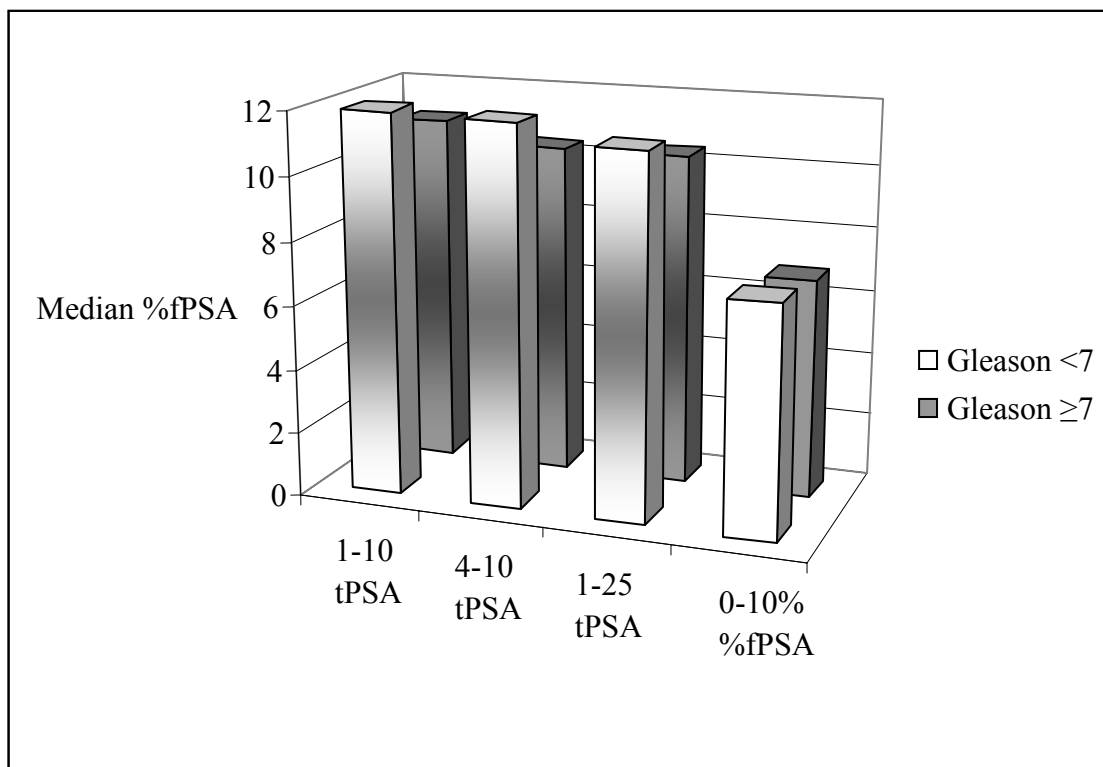


Abbildung 4: Median %fPSA in Beziehung zum Gleason-Score in definierten tPSA-Bereichen ($\mu\text{g/L}$) und %fPSA $\leq 10\%$

4.3 Beziehung zwischen (-5,-7)proPSA und pT, Grading und Gleason-Score

In Tabelle 6 sind mit den Signifikanzen des (-5,-7)proPSA zwischen pT2 und pT3, G2 und G3 sowie Gleason-Score <7 und ≥7 die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt.

Tabelle 6: Signifikanzen zwischen pT2/3, Grading 2/3 und Gleason-Score <7 und ≥7 für 3 tPSA-Bereiche bzw. %fPSA≤10

	1-10 tPSA	4-10 tPSA	1-25 tPSA	≤10% fPSA
Patienten-				
gruppe				
	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz
(-5,-7)proPSA				
pT2 vs. pT3	0,329	0,490	0,023	0,019
G2 vs. G3	0,123	0,223	0,008	0,135
Gleason-Score				
<7 vs. ≥7	0,836	0,811	0,080	0,077

In Bezug auf die (-5,-7)proPSA-Konzentration bestehen sowohl in der tPSA-Gruppe 1-25 µg/L (0,297 ng/L für pT2 vs. 0,351 ng/L für pT3, p=0,023) und im Bereich %fPSA ≤10% zwischen pT2- und pT3-Tumoren signifikante Unterschiede (0,245 ng/L für pT2 vs. 0,288 ng/L für pT3, p=0,019).

Für die tPSA-Untergruppen 1-10 µg/L und 4-10µg/L ließ sich ein signifikanter Unterschied der (-5,-7)proPSA-Konzentration nicht nachweisen (p=0,329 und p=0,490). Die graphische Darstellung dieses Sachverhaltes erfolgt in Abbildung 5, signifikante Unterschiede im Median (-5,-7)proPSA sind hervorgehoben.

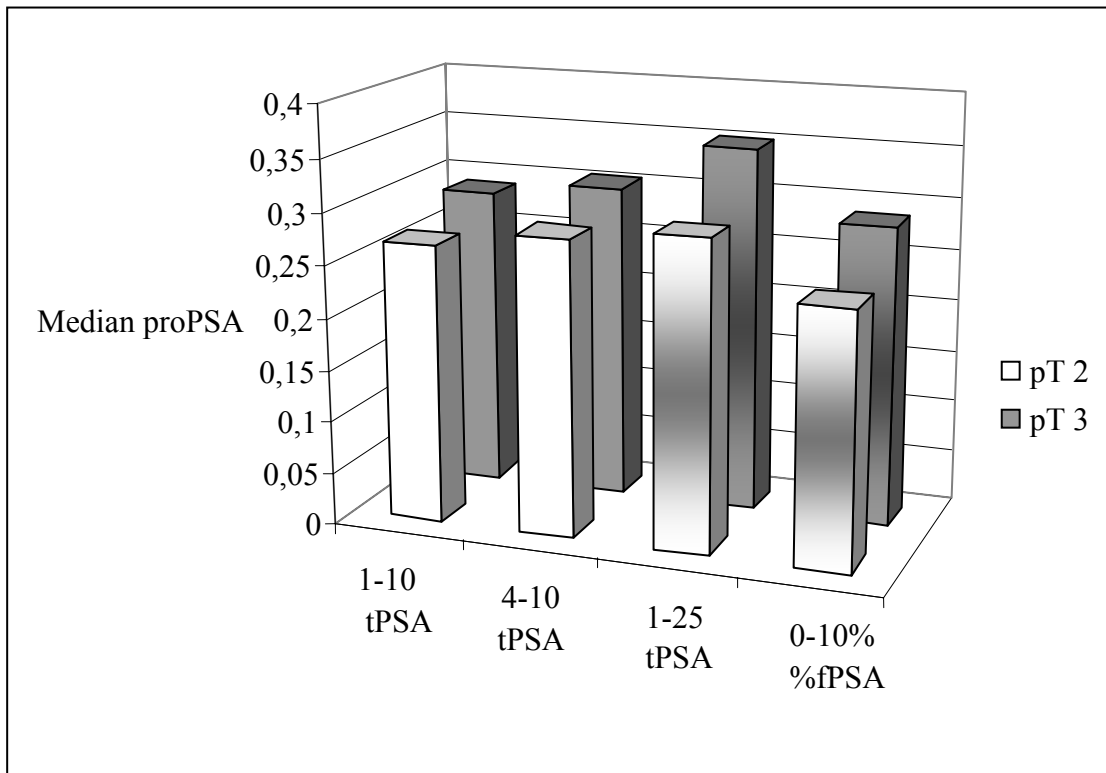


Abbildung 5: Median (-5,-7)proPSA in Beziehung zum Tumorstadium pT in definierten tPSA-Bereichen ($\mu\text{g/L}$) und $\%f\text{PSA} \leq 10\%$

Bezüglich der Höhe der (-5,-7)proPSA-Konzentration besteht in der tPSA-Gruppe 1-25 µg/L ein signifikanter Unterschied zwischen G2- und G3-Tumoren (0,295 ng/L für G2 vs. 0,350 ng/L für G3, $p=0,008$). In den verbleibenden tPSA-Untergruppen sowie für %fPSA $\leq 10\%$ ließ sich ein signifikanter Unterschied nicht nachweisen ($p>0,05$). Die Abbildung 6 stellt diesen Sachverhalt graphisch dar, signifikante Unterschiede im Median (-5,-7)proPSA sind hervorgehoben.

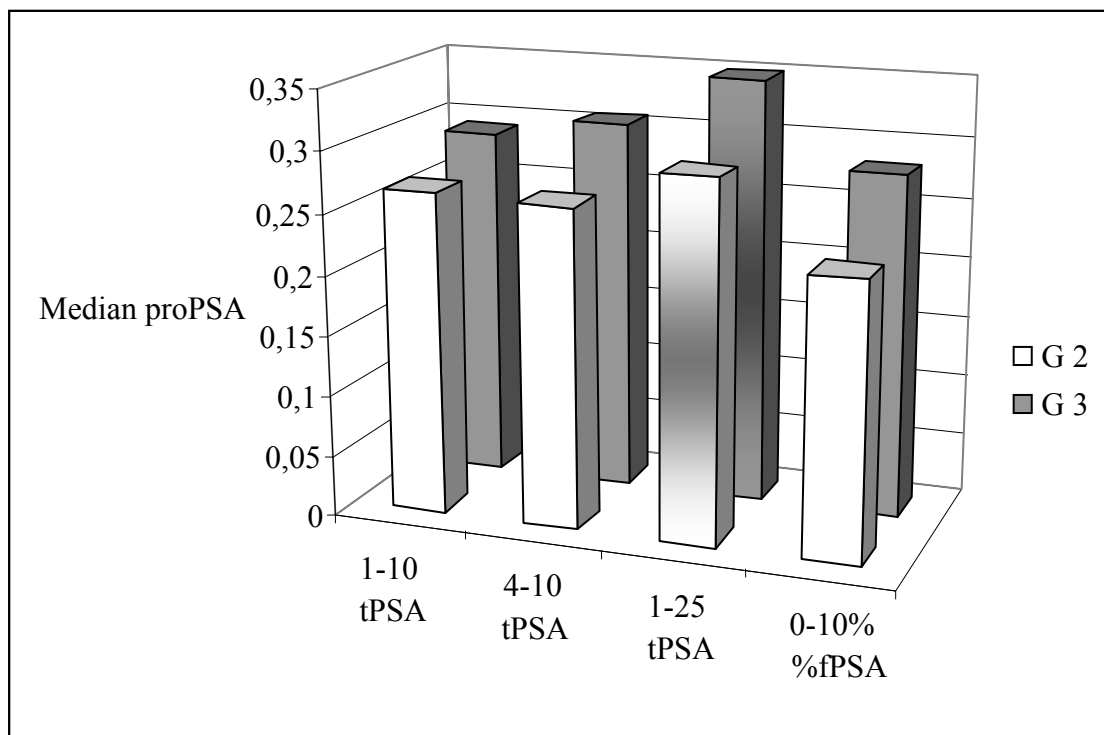


Abbildung 6: Median (-5,-7)proPSA in Beziehung zum Grading G in definierten tPSA-Bereichen ($\mu\text{g/L}$) und %fPSA $\leq 10\%$

Für den Wert (-5,-7)proPSA ließ sich entgegen zum tPSA und %fPSA in allen untersuchten tPSA-Gruppen einschließlich %fPSA $\leq 10\%$ kein signifikanter Unterschied zwischen weniger aggressiven Tumoren mit Gleason-Score < 7 und aggressiven Tumoren mit Gleason-Score ≥ 7 nachweisen ($p > 0,05$). In Abbildung 7 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt. Trotz sichtbarer Differenzen des (-5,-7)proPSA in der Gruppe der Patienten mit %fPSA-Werten $\leq 10\%$ erreicht der Unterschied zwischen den Tumoren mit Gleason-Score < 7 - und Gleason-Score ≥ 7 kein Signifikanzniveau ($p = 0,077$).

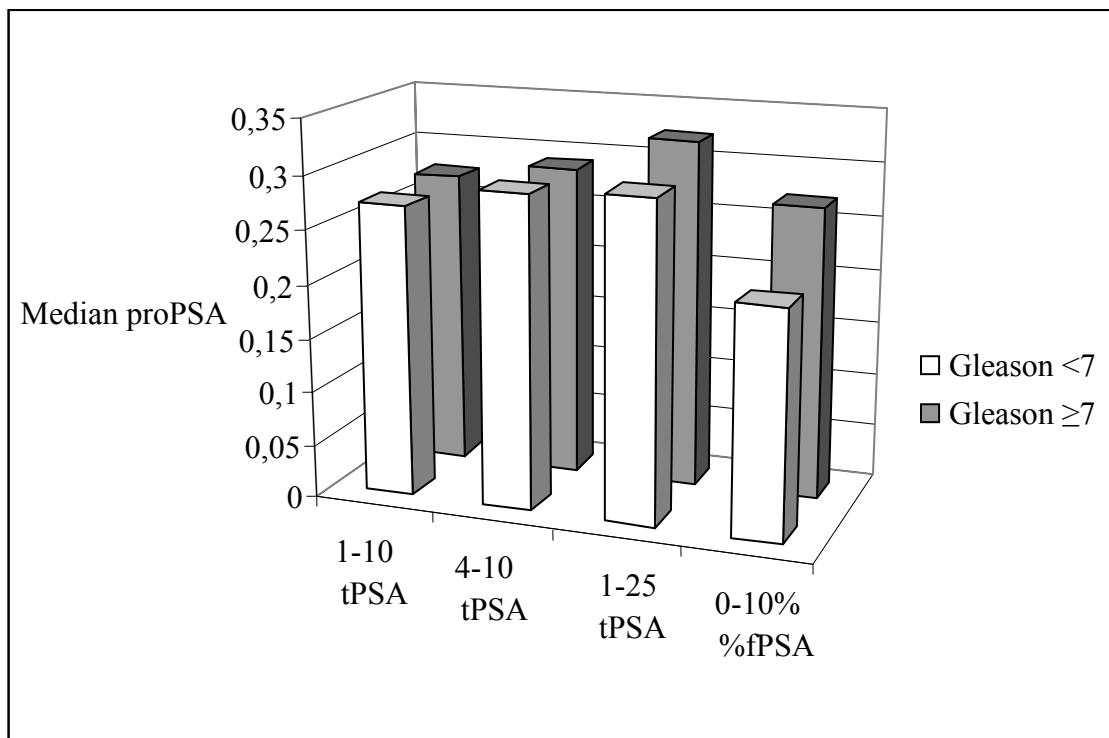


Abbildung 7: Median proPSA in Beziehung zum Gleason-Score in definierten tPSA-Bereichen ($\mu\text{g/L}$) und %fPSA $\leq 10\%$

4.4 Beziehung zwischen (-5,-7)proPSA/tPSA und pT, Grading und Gleason-Score

Als weiterer möglicher Parameter wurde der Quotient aus (-5,-7)proPSA und tPSA ((-5, -7)proPSA/tPSA) berechnet. In Tabelle 7 sind die Signifikanzen zwischen pT2/3, G2/3 und Gleason-Score <7 und Gleason-Score \geq 7 in Bezug auf diesen Quotienten dargestellt.

Tabelle 7: Signifikanzen zwischen pT2/3, Grading 2/3 sowie Gleason-Score <7 und \geq 7 für 3 tPSA-Bereiche bzw. %fPSA \leq 10%

	1-10 tPSA	4-10 tPSA	1-25 tPSA	\leq 10% fPSA
Patienten-				
gruppe				
	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz
(-5,-7)proPSA/tPSA				
pT2 vs. pT3	0,658	0,582	0,921	0,335
G2 vs. G3	0,457	0,227	0,990	0,417
Gleason-Score				
<7 vs. \geq 7	0,340	0,806	0,094	0,750

Der Quotient (-5,-7)proPSA/tPSA unterschied sich in keinem der untersuchten tPSA-Bereiche und bei %fPSA-Werten \leq 10% weder zwischen pT2- und pT3-Tumoren noch zwischen G1-2 und G3-Tumoren oder zwischen aggressiven (Gleason-Score \geq 7) und weniger aggressiven (Gleason-Score <7) Tumoren ($p > 0,05$).

4.5 Beziehung zwischen (-5,-7)proPSA/(%fPSA) und pT, Grading und Gleason-Score

Mit dem Quotienten aus (-5,-7)proPSA und tPSA $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ wurde eine weitere Variable berechnet. In Tabelle 8 sind die Signifikanzen zwischen pT2/3, G2/3 und Gleason-Score <7 und Gleason-Score ≥ 7 in Bezug auf diesen Quotienten dargestellt.

Tabelle 8: Signifikanzen zwischen pT2/3, Grading 2/3 sowie Gleason-Score <7 und ≥ 7 für 3 tPSA-Bereiche bzw. $\%f\text{PSA} \leq 10\%$

Patienten- gruppe	1-10 tPSA	4-10 tPSA	1-25 tPSA	$\leq 10\%$ fPSA
	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz	Signifikanz
(-5,-7)proPSA/(%fPSA)				
pT2 vs. pT3	0,056	0,078	0,000	0,002
G2 vs. G3	0,022	0,009	0,004	0,112
Gleason-Score				
<7 vs. ≥ 7	0,014	0,007	0,001	0,043

In Bezug auf die Höhe des Quotienten $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ bestehen signifikante Unterschiede zwischen pT2- und pT3-Tumoren sowohl in der tPSA-Gruppe 1-25 $\mu\text{g/L}$ (0,030 ng/L für pT2 vs. 0,038 ng/L für pT3, $p=0,000$) als auch im $\%f\text{PSA}$ -Bereich $\leq 10\%$ (0,035 ng/L für pT2 vs. 0,044 ng/L für pT3, $p=0,002$). In den untersuchten tPSA-Untergruppen 1-10 und 4-10 $\mu\text{g/L}$ ließ sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p>0,05$).

In Abbildung 8 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt, signifikante Unterschiede im Median $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ sind hervorgehoben.

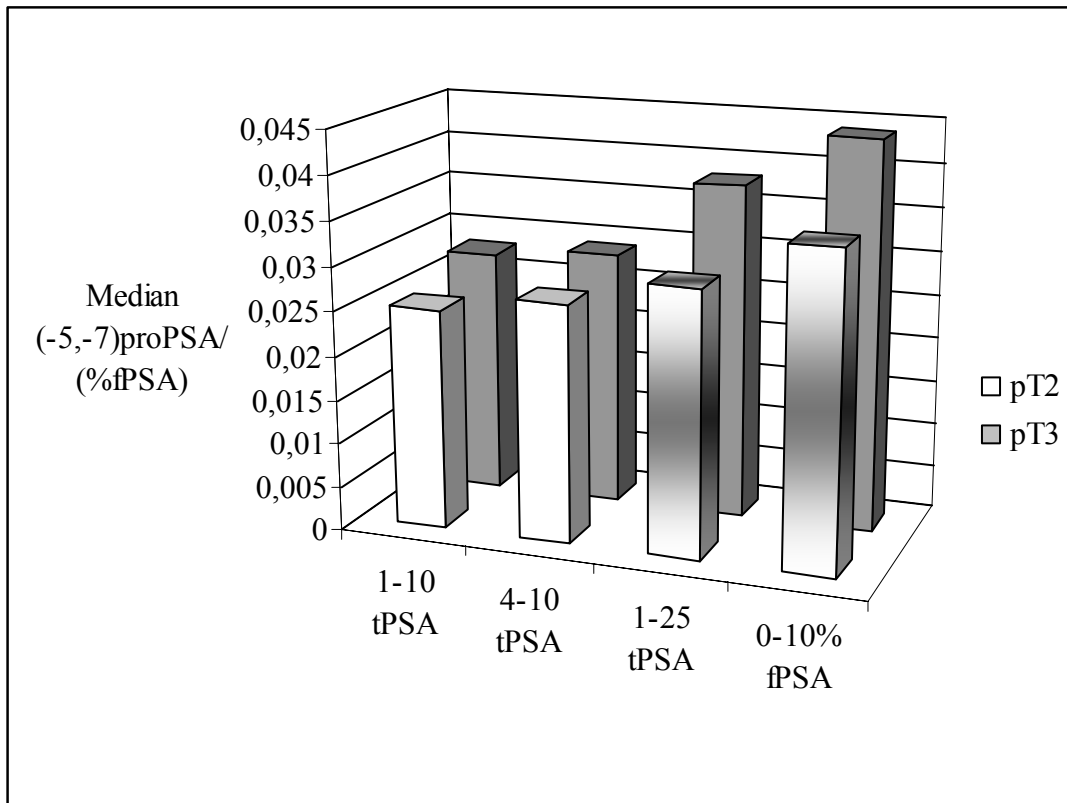


Abbildung 8: Median (-5,-7)proPSA/(%fPSA) in Beziehung zum Tumorstadium pT in definierten tPSA-Bereichen ($\mu\text{g/L}$) und %fPSA $\leq 10\%$

Der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/\%f\text{PSA}$ ist in allen untersuchten tPSA-Untergruppen in der Lage, zwischen G1-2- und G3-Tumoren zu differenzieren. Für den Bereich $\%f\text{PSA} \leq 10\%$ ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p > 0,05$).

In Abbildung 9 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt, signifikante Unterschiede im Median $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ sind hervorgehoben.

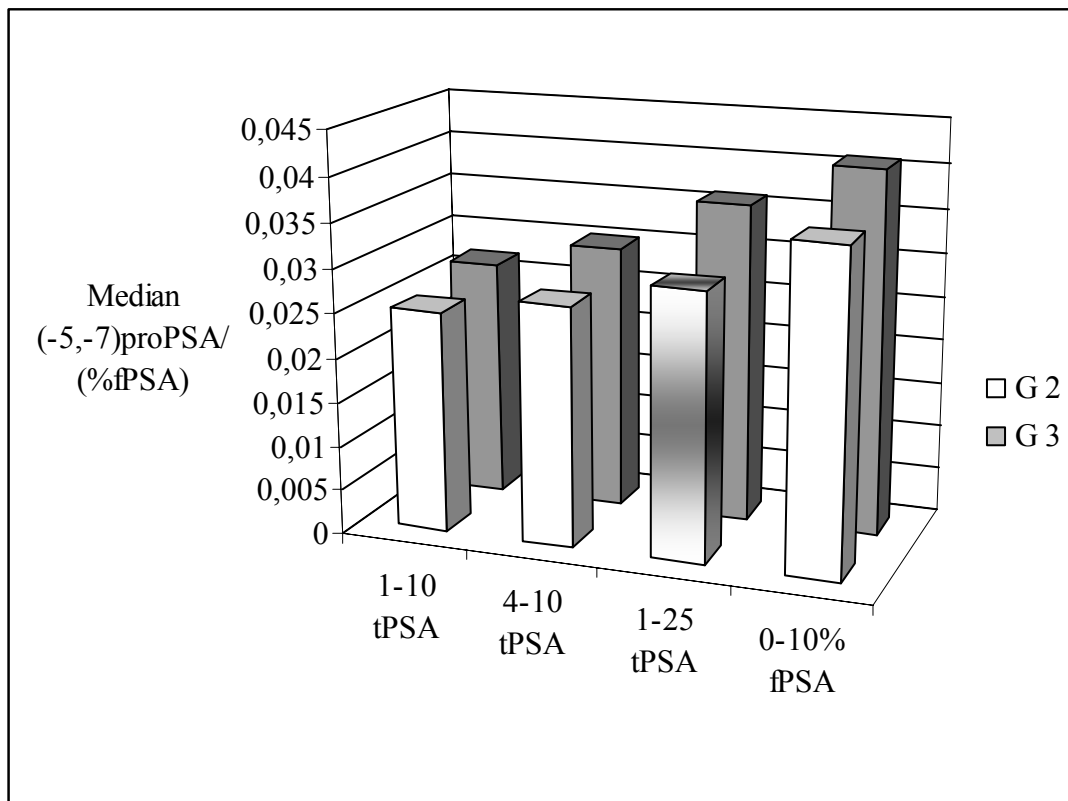


Abbildung 9: Median $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ in Beziehung zum Grading G in definierten tPSA-Bereichen und $\%f\text{PSA} \leq 10\%$

Der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ differenziert sowohl in allen untersuchten tPSA-Gruppen als auch im Bereich $\%f\text{PSA} \leq 10\%$ zwischen wenig aggressiven (Gleason-Score <7) und aggressiven Tumoren (Gleason-Score ≥ 7). Dieses ist eines der wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit. Abbildung 10 verdeutlicht diese signifikanten Unterschiede noch einmal.

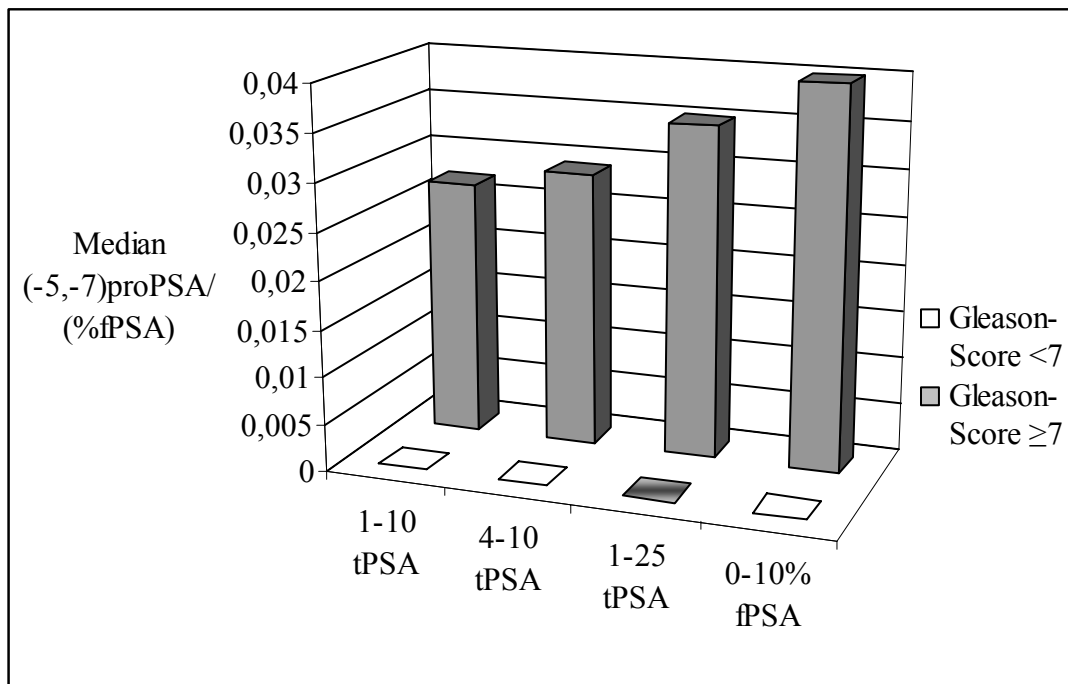


Abbildung 10: Median $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ in Beziehung zum Gleason-Score in definierten tPSA-Bereichen und $\%f\text{PSA} \leq 10\%$

Zusammenfassend erfolgte in den vorhergehenden Abschnitten die statistische und graphische Darstellung der Werte tPSA, fPSA, $(-5,-7)\text{proPSA}$ sowie der Quotienten $(-5,-7)\text{proPSA}/\text{tPSA}$ und $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ in ihren Beziehungen zu Tumorstadium pT, Tumorstadium G und Gleason-Score.

Im Vorfeld wurde auch der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/\text{fPSA}$ einer ersten statistischen Analyse unterzogen. Hier ergab die Berechnung der Median-Werte bezüglich Differenzierung zwischen pT2 und pT3 als auch G2 und G3 sowie Gleason-Score <7 und ≥ 7 keine statistische Signifikanz. Möglicherweise erlangt dieser Quotient in Zukunft mit einer anderen proPSA-Form Bedeutung im Hinblick auf Vorhersage von Tumorstadium, -grading und Gleason-Score eines PCa.

4.6 Spearman'scher Korrelationskoeffizient r_s

Die Korrelationen der nicht metrisch skalierten Variablen tPSA, fPSA, %fPSA und (-5,-7)proPSA, welche nicht die Bedingungen der Normalverteilung erfüllen, wurden unter Verwendung des Spearman'schen Korrelationskoeffizienten r_s ermittelt. Dieser wurde in den tPSA-Intervallen 1-10 $\mu\text{g/L}$, 4-10 $\mu\text{g/L}$, 1-25 $\mu\text{g/L}$ sowie im Bereich %fPSA $\leq 10\%$ berechnet.

Die Variablen tPSA, fPSA und (-5,-7)proPSA waren in allen untersuchten PSA-Intervallen bzw. im Bereich %fPSA $\leq 10\%$ signifikant positiv (direkte Proportionalität) zueinander korreliert ($p < 0,05$). Ebenso sichtbar wird hier die negative Korrelation (indirekte Proportionalität) zwischen tPSA und %fPSA in allen untersuchten tPSA-Intervallen sowie im Bereich %fPSA $\leq 10\%$. Diese Zusammenhänge sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Spearman'scher Korrelationskoeffizient r_s in differenten tPSA-Intervallen sowie im Bereich %fPSA $\leq 10\%$ zwischen den Variablen tPSA, fPSA, %fPSA, (-5,-7)proPSA (hier proPSA) sowie Signifikanz der Korrelationen (kursiv)

	r_s tPSA/fPSA	r_s tPSA/ %fPSA	r_s tPSA/ (-5,-7)proPSA	r_s (-5,-7)proPSA/ fPSA
tPSA 1-10 $\mu\text{g/L}$ <i>p-Wert</i>	0,595 <i><0,0001</i>	-0,138 <i>0,022</i>	0,368 <i><0,0001</i>	0,750 <i><0,0001</i>
tPSA 4-10 $\mu\text{g/L}$ <i>p-Wert</i>	0,445 <i><0,0001</i>	-0,056 <i>0,372</i>	0,242 <i><0,0001</i>	0,721 <i><0,0001</i>
tPSA 1-25 $\mu\text{g/L}$ <i>p-Wert</i>	0,683 <i><0,0001</i>	-0,257 <i><0,0001</i>	0,437 <i><0,0001</i>	0,759 <i><0,0001</i>
%fPSA $\leq 10\%$ <i>p-Wert</i>	0,845 <i><0,0001</i>	-0,189 <i>0,01</i>	0,529 <i><0,0001</i>	0,715 <i><0,0001</i>

4.7 Logistische Regression

Die logistische Regressionsanalyse wurde ebenfalls angewendet, um zwischen Patienten mit pT2- und pT3-4-, mit G1-2 und G3- und mit Gleason-Score <7 - bzw. ≥ 7 - Tumoren zu unterscheiden.

Unter Zuhilfenahme der einzelnen Variablen tPSA, %fPSA, $(-5,-7)$ proPSA und $(-5,-7)$ proPSA/tPSA ergab sich eine korrekte Klassifizierung von 72% für das Tumorstadium pT für alle Variablen ausser dem $(-5,-7)$ proPSA/(%fPSA), 68% für das Tumorigradung G und 60% für den Gleason-Score. Das tPSA war dabei minimal stärker bei Differenzierung des Gratings (69% der Fälle richtig erkannt), während es bei der Differenzierung des Gleason-Scores mit 59% der richtig erkannten Fällen den anderen Parametern leicht unterlegen war.

Unter Einschluss aller Variablen zeigte sich, dass keiner der Parameter einschließlich des Quotienten proPSA/%fPSA die Fähigkeit hatte, pT2- von pT3-, G1-G2- von G3- oder aggressive von nicht aggressiven Tumoren weder in der Gruppe aller Patienten noch in den Subgruppen zu trennen. Bezüglich der Differenzierung des Tumorstadiums sind es im Vorwärts-Verfahren die Variablen tPSA und $(-5,-7)$ proPSA (74% korrekt erkannte Fälle), die am meisten zur Differenzierung beitragen. Im Rückwärts-Verfahren sind es mit ebenfalls 74% korrekt erkannter Fälle die Variablen %fPSA, $(-5,-7)$ proPSA und der Quotient $(-5,-7)$ proPSA/(%fPSA). In Bezug auf die Differenzierung des Tumorigradings trägt sowohl im Vorwärts- als auch im Rückwärts-Verfahren die Variable $(-5,-7)$ proPSA mit 68% korrekt erkannter Fälle am meisten zur Differenzierung bei. Zur Unterscheidung nach dem Gleason-Score sind es sowohl im Vorwärts- als auch im Rückwärts-Verfahren mit 62% korrekt erkannter Fälle die Variablen tPSA und $(-5,-7)$ proPSA/(%fPSA), die am meisten zur Differenzierung beitragen.

Die Unterscheidung zwischen pT2 und pT3 gelang mithilfe aller Variablen unter Verwendung der Einschluss-, Vorwärts- und Rückwärts-Verfahren bei 74 bis 75% der Fälle, während beim Grading 68-70% der Fälle und bei der Tumoraggressivität 61-62% der Fälle richtig klassifiziert worden sind.

Die logistische Regression im Einschluss-, Vorwärts- und Rückwärts-Verfahren ergab für die Variable $(-5,-7)$ proPSA/(%fPSA) einen Wald-Koeffizienten von 5,7-12,5.

Dieser Quotient erwies sich damit in Bezug auf die Diskriminierung von Tumorstadium und Gleason-Score als die trennschärfste Variable.

Die Variable (-5,-7)proPSA erreichte im Hinblick auf die Trennung der Tumorstadien pT2/pT3 lediglich einen Waldkoeffizienten von 3,6-7,5. Eine Differenzierung der einzelnen Wald-Koeffizienten und die jeweils stärkste Variable nach den 3 Methoden der logistischen Regression zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Wald-Koeffizient nach Einschluss-, Vorwärts-und Rückwärts-Methode

	Maximaler Waldkoeffizient Tumorstadium	Maximaler Waldkoeffizient Tumorgrading	Maximaler Waldkoeffizient Gleason-Score
Einschluss	11,6 (-5,-7)proPSA/ (%fPSA)	3,6 (-5,-7)proPSA	5,7 (-5,-)proPSA/ (%fPSA)
Vorwärts	12,1 (-5,-7)proPSA/ (%fPSA)	7,5 (-5,-7)proPSA	6,1 (-5,-7)proPSA/ (%fPSA)
Rückwärts	12,5 (-5,-7)proPSA/ (%fPSA)	7,5 (-5,-7)proPSA	6,15 (-5,-7)proPSA/ (%fPSA)

4.8 ROC-Kurven der einzelnen Variablen

Die Berechnung der AUC und deren Darstellung in den folgenden ROC-Kurven ergaben für keine der untersuchten Variablen einen zusätzlichen Nutzen bezüglich der Differenzierung zwischen pT2/pT3, G1-2/G3 und Gleason-Score $<7/\geq 7$.

Die Abbildungen 13, 14 und 15 bilden die ROC- Kurven der hier untersuchten Variablen in Bezug auf ihre Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen pT2/pT3, G1-2/G3 und Gleason-Score $<7/\geq 7$ ab.

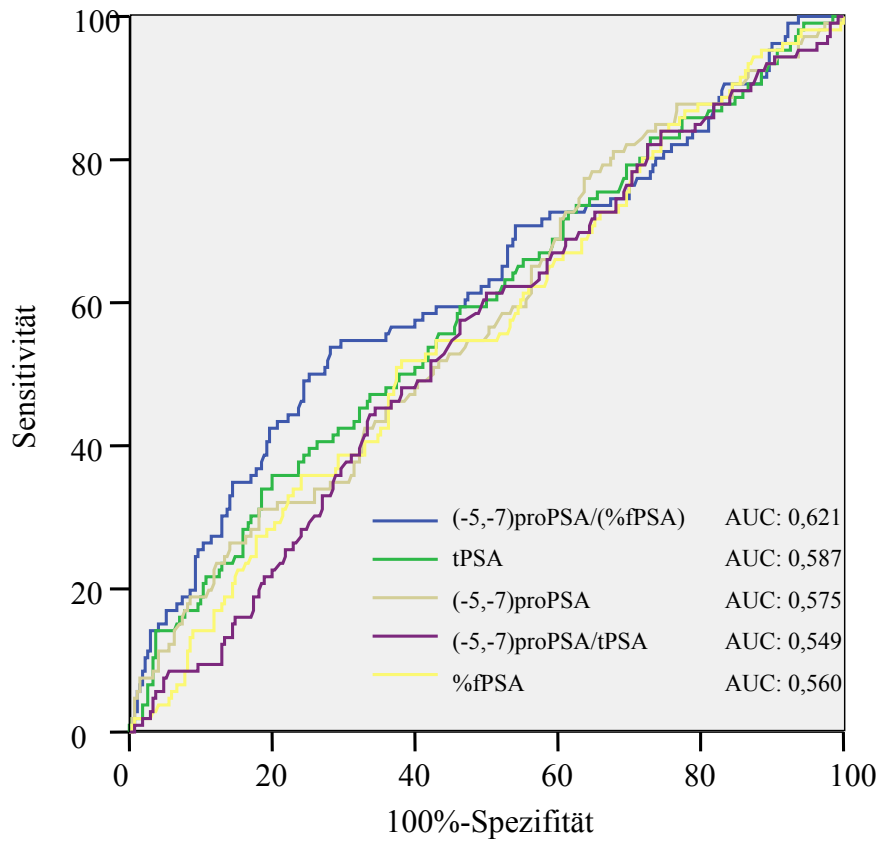


Abbildung 11: ROC-Kurven der diagnostischen Tests zur Differenzierung zwischen pT2/pT3-Tumoren

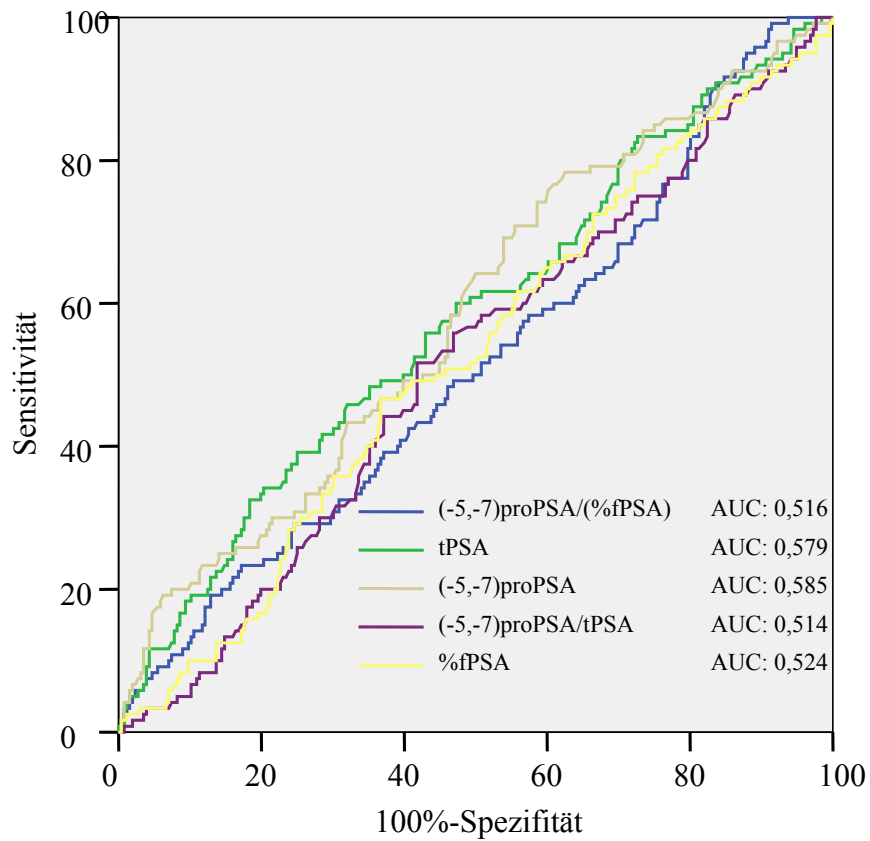


Abbildung 12: ROC-Kurven der diagnostischen Tests zur Differenzierung zwischen Tumorgrading G2 und G3

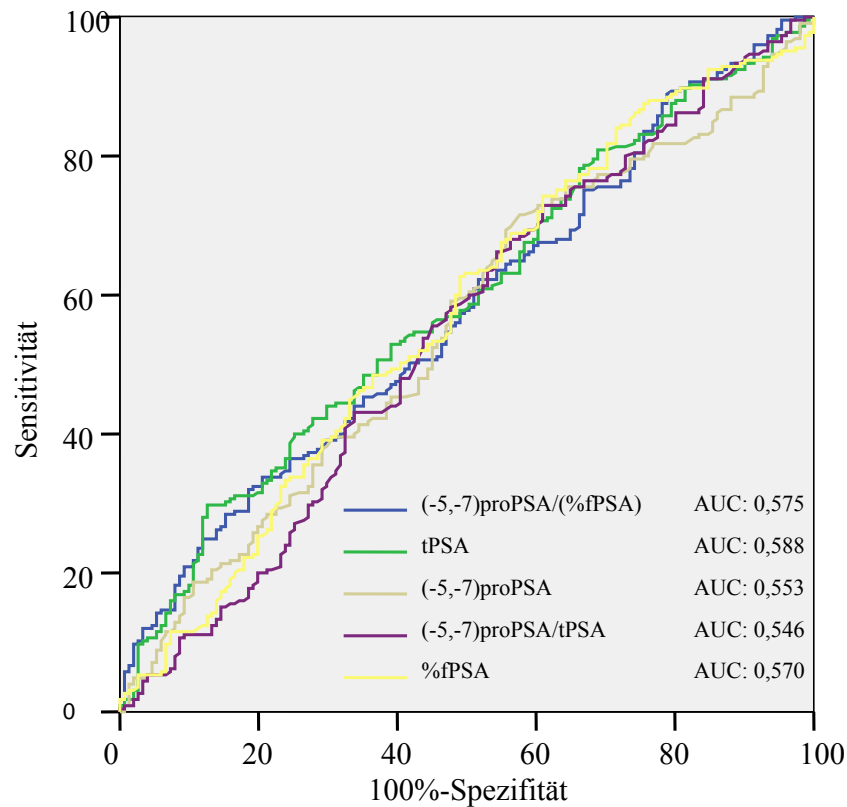


Abbildung 13: ROC-Kurven der diagnostischen Tests zur Differenzierung zwischen Gleason-Score $<7/\geq 7$

Zusammenfassend ergab sich nach Berechnung der logistischen Regression und Darstellung der Einzelvariablen in der ROC-Kurven-Analyse folgendes Bild.

In Bezug auf die Unterscheidung nach Tumorstadium pT erwies sich die Variable (-5,-7)proPSA/(%fPSA) als bester Diskriminator. In der Differenzierung des Tumorgradings erwiesen sich die Variablen tPSA und (-5,-7)proPSA am geeignetsten.

In Bezug auf die Differenzierung nach dem Gleason-Score erschienen die Variablen (-5,-7)proPSA/(%fPSA) und tPSA am suffizientesten.

4.9 ROC-Kurven aller Variablen mit Bewertung des Regressionsmodells

Mittels der Ausgangswerte der logistischen Regression unter Zuhilfenahme aller untersuchten Variablen wurden ebenfalls ROC-Kurven erstellt. Dabei war ersichtlich, dass bei der Differenzierung der Tumorstadien pT2 und pT3 mittels der logistischen Regression mit einer AUC von 0,66 für 2 Modelle (Einschluss- und Rückwärts-Verfahren) und einer AUC von 0,62 (Vorwärtsverfahren) für das 3. Modell eine signifikant von 0,5 verbesserte AUC erreicht wird. Unter alleiniger Nutzung des tPSA (AUC 0,59) und des (-5,-7)proPSA (AUC 0,575) ist keine Trennung zwischen pT2 und pT3 möglich. Der Quotient (-5,-7)proPSA/(%fPSA) mit einer AUC von 0,62 erreicht zwar fast die AUC unter Nutzung der logistischen Regressionsmodelle mit Einschluss- ($p=0,016$) und Rückwärts-Verfahren ($p=0,009$), aber es besteht eine signifikant verbesserte Aussage mithilfe der logistischen Regression.

Die Anwendung der 3 logistischen Regressionsmodelle (AUC: zweimal 0,585 und 0,59 für Einschlussverfahren) zur Verbesserung der Differenzierung G2 und G3 zeigt gegenüber dem tPSA (AUC: 0,58) oder dem (-5,-7)proPSA (AUC: 0,585) im Gegensatz zur pT2/pT3-Unterscheidung keinerlei Verbesserung ($p=0,73$ bis $0,97$).

Die Differenzierung der aggressiven Tumore mit Gleason-Score <7 vs. ≥ 7 kann nur mithilfe des Einschlussverfahrens (AUC: 0,62) signifikant gegenüber dem tPSA (AUC: 0,59; $p=0,016$) und dem Quotienten proPSA/(%fPSA) (AUC: 0,575; $p=0,001$) verbessert werden. Die anderen beiden Verfahren der logistischen Regression (AUC: jeweils 0,61) sind nicht signifikant besser als tPSA (jeweils $p=0,18$). Eine wesentliche Verbesserung durch die Nutzung der logistischen Regression mit den verschiedenen Parametern unter Gebrauch des (-5,-7)proPSA ist somit zur Unterscheidung des pathologischen T-Stadiums nur teilweise möglich und zur Unterscheidung der Tumoraggressivität (G2 vs. G3) nicht ersichtlich. Das Einschlussverfahren der logistischen Regression erreicht als einzige Methode eine signifikant verbesserte Unterscheidung zwischen Gleason-Score <7 und ≥ 7 . Die Diskriminationsfähigkeit des Quotienten (-5,-7)proPSA/(%fPSA) zur Unterscheidung der Tumoraggressivität kann durch die Nutzung der verschiedenen logistischen Regressionsmodelle nur unwesentlich verbessert werden. Etwas günstiger stellt sich die Situation bei der Verbesserung der Vorhersage des pathologischen Tumorstadiums dar,

denn dort sind 2 Modelle der logistischen Regression den Einzelparametern bzw. Quotienten signifikant überlegen.

5 Diskussion

Das PSA ist der zzt. bedeutendste Tumormarker der urologischen Onkologie in Bezug auf Früherkennung, Staging und Verlauf eines PCa (22, 51). Alle Aspekte dieser Studie beziehen sich auf die diagnostische Wertigkeit des (-5,-7)proPSA und seiner Quotienten mit tPSA und dem %fPSA zur Differenzierung von Tumorstadium und –grading. Anhand der Daten von 376 Patienten wurden verbesserte Möglichkeiten des (-5,-7)proPSA/(%fPSA) im Vergleich mit (-5,-7)proPSA oder dem %fPSA allein in der Unterscheidung zwischen aggressiven von weniger aggressiven Formen des PCa demonstriert. Mithilfe verschiedener Modelle der logistischen Regression konnten die Ergebnisse sogar teilweise noch verbessert werden, vor allem bezüglich der besseren Prädiktion des pathologischen T-Stadiums und der Aggressivität des Tumors.

Obwohl die Bestimmung des (-5,-7)proPSA alleine eine eher begrenzte Wertigkeit in Bezug auf die Differenzierung zwischen malignen und nichtmalignen Prostataerkrankungen hat, ist die proPSA-Bestimmung eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Vorhersage der Aggressivität eines PCa. Hierin liegt auch der große Nachteil des PSA. Neben dem Mangel an Spezifität ist eine Abschätzung der Tumorigressivität sowie der Prognose kaum möglich (103). Bei der Diagnostik des PCa führt der allgemein akzeptierte Grenzwert von 4 µg/L zu einer Rate von ca. 60-80% falsch-positiver Befunde. Auch in der sog. „Grauzone“ der Prostatakarzinomdiagnostik zwischen 4 und 10 µg/L differenziert das PSA nicht eindeutig zwischen BPH und PCa. Das PSA besitzt in diesem Bereich lediglich eine Spezifität von 25%. Hier können sowohl die BPH und andere benigne Erkrankungen der Prostata, aber auch ein PCa, ursächlich für die PSA-Erhöhung sein (151). Der Wert %fPSA ist der einzige zusätzlich existierende etablierte klinische Routineparameter zur besseren Diskrimination zwischen PCa und BPH (18, 103). Jeder neue Parameter zur PCa-Detektion muss sich am %fPSA und seiner Fähigkeit, die Spezifität dieser Diskrimination zu erhöhen, messen lassen.

Seit seiner klinischen Einführung Mitte der 80er Jahre wird das PSA als Gesamt-PSA (tPSA) gemessen. Weitere Studien zum PSA konnten zeigen, dass das PSA sowohl im Plasma als auch in der Seminalflüssigkeit aus einer heterogenen Mischung verschiedener freier und gebundener PSA-Subfraktionen besteht (24, 63, 129). Zusätzlich besteht auch die freie Fraktion des PSA aus weiteren verschiedenen molekularen Erscheinungsformen.

In zahlreichen präklinischen Studien gelingt mittlerweile der Nachweis potentiell karzinom- und BPH-spezifischer Varianten der freien Fraktion des PSA. Die weitergehende Erforschung dieser verschiedenen molekularen Formen eröffnet neue Möglichkeiten zur diagnostischen Unterscheidung zwischen PCa und BPH (34, 63, 129, 133).

Es erfolgt im Anschluss zunächst ein Überblick über PSA-Komplexe, welche durch Bindung des PSA an verschiedene Proteaseinhibitoren entstehen.

5.1 Molekulare Formen des PSA: PSA-Komplexe

5.1.1 ACT-PSA

Ungefähr 70-90% des Gesamt-PSA sind an den Serinproteaseinhibitor Antichymotrypsin (ACT) gebunden. Die ACT-PSA-Konzentrationen sind bei Patienten mit einem PCa höher als bei BPH-Patienten (24, 63, 129). Zwischen der Konzentration an ACT-PSA und dem Gesamt-PSA besteht eine direkte Korrelation. Verschiedene präanalytische Probleme, wie der Verlust an Immunreaktivität, die Dissoziation der PSA-Komplexe während der Lagerung des Serums oder Überbestimmungen des ACT-PSA-Komplexes auf Grund eines gleichzeitig bestehenden ACT-Cathepsin-G-Komplexes konnten gelöst werden (152). Die beschriebenen Probleme der Messung des ACT-PSA-Komplexes führten dazu, dass bisher die Bestimmung des freien PSA statt des PSA-ACT-Komplexes zur Berechnung des Verhältnisses zwischen freiem und gebundenem PSA herangezogen wurde. Durch den Einsatz von spezifischen ACT-PSA-Antikörpern mit geringer Kreuzreaktivität gegenüber ACT, fPSA und dem ACT-Cathepsin-Komplex, durch den Zusatz von Heparin (101) oder speziellen Blockierungsreagenzien zum Bestimmungsansatz (152) konnten diese Schwierigkeiten beseitigt werden. Der Nutzen der ACT-PSA-Bestimmung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Dies ist möglicherweise bedingt durch die beschriebenen analytischen Schwierigkeiten (24, 56, 152). Einige Autoren empfehlen die Messung von ACT-PSA und die Berechnung des ACT-PSA/tPSA-Quotienten statt des Quotienten aus freiem und Gesamt-PSA (%fPSA) zur besseren Differenzierung zwischen PCa und BPH (24, 56, 129, 152). In den Untersuchungen von Jung und Kollegen (42) wurde ein Prototyp-Assay zur ACT-PSA-Bestimmung im Serum getestet. Es konnte hier kein Vorteil der ACT-PSA-Bestimmung

zur Differenzierung zwischen PCa und BPH belegt werden. Dies gilt sowohl für die alleinige ACT-PSA-Bestimmung im Vergleich zur tPSA-Bestimmung als auch für den Quotienten ACT-PSA/tPSA im Vergleich zum %fPSA (42). Diese Daten konnten auch durch andere Autoren bestätigt werden (93, 126).

5.1.2 API-PSA-Komplex

Mit fortschreitender Entwicklung von hochsensitiven Enzymimmunoassays konnten weitere PSA-Komplexe zuverlässig quantifiziert werden.

Für den API-PSA-Komplex wurde ein Test analog dem ACT-PSA-Assay mit Antikörperspezifität für API entwickelt (159). Die Menge des API-PSA-Komplexes betrug 1,6% des tPSA bei BPH-Patienten und 0,9% bei Patienten mit PCa (29). Die Unterschiede des Quotienten API-PSA/tPSA waren signifikant zwischen PCa (3,2%) und BPH (4,1%) (159). Wegen des geringen Anteils des API-PSA am Gesamt-PSA ist ein zukünftiger Einsatz des API-PSA-Komplexes zur Differenzierung zwischen PCa und BPH eher fraglich.

5.1.3 A2M-PSA-Komplex

Mehrere Forschungsgruppen beschäftigten sich seit Mitte der 1990er Jahre mit der Detektion des α -2-Makroglobulin (A2M)-PSA-Komplexes (57, 142).

Unter in vivo und in vitro-Bedingungen konnte eine schnellere und aggressivere Bindung des PSA an A2M als an das ACT nachgewiesen werden (57, 142). Auch hier konnte erst nach langwierigen Forschungen ein Immunoassay zum Nachweis des A2M-Komplexes im Serum entwickelt werden (158). Das größte Hindernis stellte hier die komplette Verdeckung aller Epitope des PSA durch das A2M dar. Mittels pH-Variation konnte der A2M-Komplex schonend aufgespalten und messbar gemacht werden (158). Karzinompatienten zeigten so einen Anteil von 12% des A2M-PSA am tPSA, BPH-Patienten wiesen einen signifikant höheren Anteil von 17% auf. Eine andere Arbeitsgruppe entwickelte ebenfalls ein Assay zur Detektion des PSA-A2M-Komplexes (64). Jedoch konnte nur bei einem von 18 PCa-Patienten vor radikaler Prostatektomie dieser Komplex im Serum nachgewiesen werden (64). Postoperativ waren fast alle Werte ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze. Zusammenfassend können wegen noch be-

stehender analytischer Probleme zzt. noch keine endgültigen Aussagen über die klinische Validität dieses Parameters getroffen werden.

5.1.4 Kompleziertes PSA (cPSA)

Mit dem kommerziell erhältlichen Test zur cPSA-Bestimmung der Firma Bayer Diagnostics wird neben dem überwiegend vorhandenem ACT-PSA-Komplex auch der API (α -1-Protease-Inhibitor)-PSA-Komplex erfasst (2, 106).

Der A2M-PSA-Komplex wird messtechnisch nicht bestimmt (106). Dieser Test nutzt die spezielle Bindungsfähigkeit des blockierenden monoklonalen Antikörpers MM 1. Dieser zum Nachweis von tPSA verwendete Antikörper verliert in Anwesenheit eines 2. für fPSA spezifischen monoklonalen Antikörpers (ME 2) seine Bindungsfähigkeit zum fPSA. Der MM 1-Antikörper misst dann alle PSA-Komplexe, aber nicht das freie PSA (2). Damit stellt das cPSA keine weitere molekulare Form des PSA dar, sondern ist messtechnisch die Summe aus ACT-PSA und API-PSA und womöglich anderen PSA-Komplexen (2).

Eine initiale Studie an 36 PCa- und 117 BPH-Patienten ermittelte für die alleinige Bestimmung des cPSA eine größere diagnostische Validität der PCa-Detektion gegenüber dem hier noch zu beschreibenden %fPSA (11). Dies steht im Gegensatz zu zahlreichen Studien des %fPSA, welches die Spezifität der PCa-Detektion des tPSA im Bereich $<10 \mu\text{g/L}$ erhöht (18, 23, 95, 151).

In einer Studie von Jung und Kollegen war die alleinige cPSA-Bestimmung in einem tPSA-Bereich von $2-10 \mu\text{g/L}$ nicht in der Lage, die Rate unnötiger Biopsien zu reduzieren (43). Dieses konnte jedoch mit dem Quotienten cPSA/tPSA erreicht werden und war damit dem %fPSA vergleichbar. Eine multizentrische Studie konnte zwar einen Vorteil des cPSA verglichen zum tPSA zeigen (92). Lein und Kollegen (54) hingegen bestätigten diesen Vorteil des cPSA weder gegenüber dem tPSA noch dem %fPSA.

Viele andere Autoren haben ebenfalls die Wertigkeit des cPSA in Bezug auf die Diskrimination zwischen PCa und BPH untersucht, wobei die Schlussfolgerung einer Metaanalyse von Roddam et al. (108), dass cPSA dem %fPSA gleichwertig sei, eher fraglich ist (137). Das cPSA besitzt gegenüber dem fPSA mit einer höheren Serumkonzentration zwar analytische Vorteile und es weist eine größere Stabilität als fPSA auf, aber der alleinige cPSA Wert kann keine Gleichwertigkeit zum %fPSA erreichen (132).

5.2 Molekulare Formen des PSA: freies PSA

5.2.1 freies PSA (fPSA) und %fPSA

Das freie PSA (fPSA) bildet mit ca. 10-30% des tPSA die kleinere Fraktion des PSA im Serum. Die alleinige Bestimmung des fPSA ohne gleichzeitige Messung der tPSA-Konzentration ergibt keinen diagnostischen Gewinn (24, 46). Erst durch die Bildung des Quotienten aus fPSA und tPSA, auch fPSA/tPSA-Ratio oder hier %fPSA genannt, ist eine Verbesserung der diagnostischen Aussage im Hinblick auf eine Diskriminierung zwischen PCa und BPH möglich (18, 23, 46, 95, 151).

Dieser Quotient, ein Routineparameter der urologischen Praxis seit Mitte der 1990er Jahre, ist vor allem in tPSA-Bereichen $<10 \mu\text{g/L}$ wertvoll. In höheren tPSA-Bereichen besitzt das tPSA allein einen genügend hohen positiv prädiktiven Wert zur PCa-Detektion (19).

Eine Reihe an Studien existiert zur Bestimmung der Wertigkeit des %fPSA betreffs Diskriminierung zwischen PCa und BPH im tPSA-Bereich von $4-10 \mu\text{g/L}$, der sogenannten „Grauzone“ der Prostatakarzinomdiagnostik. Die Wahrscheinlichkeit, an einem PCa erkrankt zu sein, steigt mit sinkenden %fPSA-Werten (103). Eine sichere Unterscheidung zwischen PCa und BPH ist allerdings nicht möglich, in der Praxis erfolgt deshalb die ultraschallgestützte Prostatastanzbiopsie. In mehreren retrospektiven und prospektiven Studien wurde der Wert des %fPSA zur Vermeidung unnötiger Biopsien eindeutig belegt (18, 23, 43, 46, 95). Der hier benutzte %fPSA-Grenzwert schwankte zwischen 14 und 28%. Unter Gebrauch eines %fPSA-Grenzwertes von 25% konnte Catalona 95% der PCa bei gleichzeitiger Reduzierung von 20% der Prostatabiopsien erfassen (18). Partin benutzte einen %fPSA-Grenzwert von 20% und vermied damit 29% unnötiger Biopsien (95).

Im tPSA-Bereich $<4 \mu\text{g/L}$ wurde die Wertigkeit des %fPSA als Frühindikator eines PCa untersucht. Ungefähr 20% der Männer mit tPSA-Werten zwischen $2,6-4 \mu\text{g/L}$ entwickeln innerhalb von 3-5 Jahren ein klinisch fassbares PCa (31, 128). Ein tPSA-Wert zwischen 4 und $10 \mu\text{g/L}$ ist bei 30-50% der Patienten bereits mit einem lokal fortgeschrittenen Tumorstadium verbunden (19, 97). In der europäischen PCa-Screeningstudie konnte gezeigt werden, dass von 50 radikal prostatektomierten PCa-Patienten mit tPSA-Werten $<4 \mu\text{g/L}$ immerhin bereits 24 Patienten (48 %) einen Gleason-Score ≥ 7

aufwiesen. Die Mehrheit dieser Tumore war hier noch organbegrenzt (84% pT2). Die Kombination aus organbegrenztem Tumorwachstum und einem Gleason-Score ≥ 7 fand sich in diesem tPSA-Bereich dann nur noch bei 18 von 50 Patienten (36%) (115). In Kenntnis dieser Daten wurde auch im eigentlich „normalen“ tPSA-Bereich $< 4 \mu\text{g/L}$ die Wertigkeit des %fPSA zur Vorverlegung der PCa-Diagnose in ein noch kurativ behandelbares Stadium überprüft. Verschiedene Studien konnten auch hier eine verbesserte PCa-Detektion sowie die Reduktion unnötiger Biopsien nachweisen (17, 21, 45, 109).

Wie auch beim tPSA, wurde der %fPSA-Wert zu verschiedenen tumor- und patienten-abhängigen Variablen in Beziehung gebracht.

Für die Korrelation zwischen %fPSA und pathologischem Stadium bzw. Grading des PCa existieren gegensätzliche Daten. Einige Autoren berichten über eine Korrelation zwischen pathologischem Stadium des PCa und dem %fPSA-Wert (27, 89). Dieser Zusammenhang konnte durch andere Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (5, 58). Ein signifikant geringerer %fPSA-Wert geht mit kapselüberschreitendem Wachstum, hohem Gleason-Score oder großen Tumorumfängen einher (80, 123). Ebenso gelang der Nachweis von niedrigeren %fPSA-Werten in Seren von Patienten mit aggressiveren Tumoren im Vergleich zu nicht aggressiven Tumoren bereits 10 Jahre vor Diagnosestellung (13).

Die Diskriminationsfähigkeit des %fPSA in dieser vorliegenden Studie bezüglich der Unterscheidung zwischen pT2 und pT3, zwischen G2 und G3 sowie zwischen einem Gleason-Score < 7 und ≥ 7 -PCa war im Gegensatz zu anderen Studien in keinem Fall gegeben (5, 58). Das heißt, weder in verschiedenen tPSA noch %fPSA-Bereichen war der Parameter %fPSA in der Lage, das Tumorstadium oder -grading vorherzusagen. Der tPSA-Wert war hingegen im tPSA-Bereich $1-25 \mu\text{g/L}$ in der Lage, zwischen pT2 und pT3, zwischen G2 und G3 sowie zwischen Gleason-Score < 7 und ≥ 7 -PCa zu unterscheiden. Bei Betrachtung sämtlicher Subgruppen, d.h. PSA $1-10$ oder $4-10 \mu\text{g/L}$ verlor das tPSA allerdings analog zum %fPSA die Fähigkeit, zwischen den o.a. Patientengruppen zu differenzieren. Die relativ starke Ungleichverteilung des tPSA über den gesamten tPSA-Bereich könnte hier einer der Hauptgründe für die signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen allein anhand des tPSA sein.

Die histologischen Veränderungen einer „High-grade-prostatisch-intraepithelialen – Neoplasie“ stellen die Vorstufe eines PCa dar und sind oft mit einem PCa assoziiert. Die Freisetzung von PSA in den Systemkreislauf erfolgt bei einer prostatisch intra-

epithelialen Neoplasie (PIN) anders als bei einem PCa, da hier die Basalmembran noch intakt ist. Der mittlere %fPSA-Wert betrug in einer Studie 15% bei ausschließlicher PIN gegenüber 12,1% bei Patienten mit einem PCa (39). Sinkende %fPSA-Werte sind hier dann möglicherweise der Ausdruck eines sich entwickelnden PCa (131).

Die Bedeutung einer histologisch gesicherten chronischen Prostatitis in Bezug auf den %fPSA-Wert wird kontrovers diskutiert. Patienten mit chronischer Prostatitis zeigen in einer Studie %fPSA-Werte ähnlich einem PCa-Patienten (44). Die Arbeitsgruppe um Ornstein konnte bei Patienten mit chronischer und akuter Prostatitis keine Veränderung des %fPSA finden (86), hingegen konnte Scattoni den signifikant niedrigeren %fPSA-Median bei Patienten mit chronischer Prostatitis in ihrer Untersuchung nachvollziehen (111).

Zum Einfluss des Patientenalters auf den %fPSA-Wert gibt es z.T. gegensätzliche Aussagen. In einer Untersuchung an 1160 gesunden Männern konnte kein Einfluss des Patientenalters auf den %fPSA-Wert nachgewiesen werden (53). Andere Autoren berichten über gegensätzliche Veränderungen des %fPSA mit zunehmendem Alter (71, 86).

Auch das Prostatavolumen hat Einfluss auf die Diskriminationsfähigkeit des %fPSA zwischen PCa und BPH. Diese ist in zwei Studien nur bis zu einem Volumen von 40 g (135) bzw. bis zu 60 g (33) gegeben.

Die wesentlichste Anwendung des %fPSA besteht zzt. in der Indikationsstellung zur Biopsie bzw. Rebiopsie nach einmalig negativer Histologie bei Patienten mit unauffälliger DRU und einem tPSA von $<10 \mu\text{g/L}$ (52, 103, 134).

5.3 Isoformen des freien PSA

5.3.1 Biochemie der Isoformen des freien PSA

Wie oben dargestellt, ist der %fPSA-Wert ein etablierter Parameter für die Verbesserung der Spezifität in der Erkennung des PCa (18). Doch selbst bei Zuhilfenahme des %fPSA im tPSA-Bereich $4\text{-}10 \mu\text{g/L}$ werden noch immer ca. 2 von 3 Patienten einer nicht notwendigen Prostatabiopsie unterzogen. „Es sind jetzt mehr als 10 Jahre seit dem ersten Bericht über freie und komplexe (gebundene) Formen des PSA vergangen, und wir beginnen gerade erst zu verstehen, warum beide Formen existieren (75)“. Die Erkenntnis,

dass auch die freie Fraktion des PSA aus weiteren verschiedenen Isoformen besteht, bietet einen neuen, vielversprechenden Ansatz, die Diskriminierung zwischen PCa und BPH zu verbessern.

Im Folgenden wird zunächst ein kurzer Überblick zur Biochemie der freien Isoformen des PSA gezeigt, welche dann gesondert betrachtet werden mit Hauptaugenmerk auf das (-5,-7) proPSA.

Die Isoformen des freien PSA besitzen verschiedene biochemische Charakteristika, anhand derer sie sich unterscheiden lassen (34). Die PSA-Isoformen liegen im Seminalplasma dabei in deutlich höherer Konzentration vor, wobei die Verteilungsmuster des freien PSA nicht vergleichbar sind mit denen im Serum. Es existieren Isoformen mit einer durchgehenden Spaltung der Aminosäurekette. Diese gelten als Einfachkettenform bzw. „intact-PSA“. Demgegenüber stehen solche mit einer inneren Spaltung der Aminosäurekette, auch als Mehrfachkettenformen, „nicked“-oder „multichain“-Formen bezeichnet. Eine Subform der intakten Variante, bei der noch ein partiell oder komplett erhaltenes Propeptid verbleibt, wird als Vorläufer-PSA oder proPSA bezeichnet. Weitere Variationen der Isoformen entstehen durch unterschiedliche Glycosylierungsmuster, zusätzlich existieren gekürzte („truncated“) und alternativ gesplittete fPSA-Isoformen.

5.3.2 bPSA, fPSAi

Das bPSA ist eine freie PSA-Isoform mit innerer Spaltung der Aminosäurekette an den Positionen Lys 145 und Lys 182. Es wurde in erhöhter Konzentration im Prostatagewebe der Transitionalzone bei Patienten mit symptomatischer BPH nachgewiesen und daher als „benign prostatic hyperplasia associated PSA“ -bPSA-bezeichnet (78). Das bPSA hatte hier im nodulären BPH-Gewebe einen Anteil von 11,4% am tPSA. Im Karzinomgewebe und im gesunden Gewebe betrug dieser Anteil nur 3,2-4,9% des tPSA (78). Das bPSA konnte dann auch im Seminalplasma (76) und im Serum (65) von Patienten mit BPH nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen des bPSA als Subform des freien PSA im Serum bei BPH-Patienten könnten den im Vergleich zu PCa-Patienten höheren %fPSA-Wert erklären.

Eine weitere Isoform des freien PSA ist das fPSAi (34). Es weist weder eine innere Spaltung der Aminosäurekette noch ein bei den proPSA-Isoformen (s.u.) vorhandenes Propeptidresiduum auf. Das fPSAi ist enzymatisch inaktiv und bildet mit ACT keine Komplexe. Die Arbeitsgruppe um Nurmikko (82) entwickelte ein Assay zur Messung der

Konzentration an freiem inaktiven PSA (fPSAi) und proPSA mit einem Grenzwert von 0,035 µg/L. In einer Untersuchung an 383 Patienten nach Prostatabiopsie war der Quotient aus fPSAi/fPSA signifikant höher bei Patienten mit Prostatakarzinom (82). Peter et al. (100) untersuchten Patientenserien mit sehr hohen tPSA-Konzentrationen zwischen 1900-8500 µg/L. Auch hier konnte das fPSAi neben begleitenden proPSA-Isoformen nachgewiesen werden.

Des Weiteren gelang der Nachweis von Isoformem des freien PSA mit unterschiedlicher Glycosylierung, sogenannte gekürzte („truncated“) Isoformen und Isoformen mit alternativem Splicing. Alternatives Splicing ist ein Mechanismus, der es ermöglicht, aus einem Gen mehrere unterschiedliche Proteine zu generieren (34).

Die Funktion und Bedeutung letztgenannter Isoformen des freien PSA einschließlich des fPSAi in Bezug auf verbesserte Diskriminierung zwischen PCa und BPH sind noch unklar und bedürfen weiterer Forschung.

5.4 proPSA-Isoformen

Das inaktive proPSA besteht aus 244 Aminosäuren. Durch Abspaltung eines 7-Aminosäurepropeptides am N-terminalen Ende der Aminosäurekette entsteht das enzymatisch aktive intakte freie PSA-Molekül, das dann aus 237 Aminosäuren besteht (34). Mehrere Serinproteasen prostatistischen Ursprungs sind in vitro in der Lage, das PSA-Propeptid abzuspalten. Hierzu zählen das humane Kallikrein 2 (KLK2) (68), Prostase (KLK4) oder Prostin (KLK15) (140). Die gegenwärtig bekannten proPSA-Isoformen im Serum und Prostatagewebe besitzen das komplette Propeptid von 7 Aminosäuren (-7)proPSA und gekürzte Propeptidsequenzen von 1 (-1)proPSA, 2 (-2)proPSA, 4(-4)proPSA und 5(-5)proPSA (100).

Mikolajczyk et al. (73) beschrieben 1997 erstmals eine proPSA-Isoform im Serum von PCa-Patienten in Form des (-4)proPSA. Ebenfalls durch die Arbeitsgruppe um Mikolajczyk wurde im Jahr 2000 der vermehrte Anteil der (-2)proPSA und (-4)proPSA-Isoform in PCa-Gewebe nach Prostatektomie im Vergleich zu BPH-Gewebe beschrieben (77). Mittels Immunhistochemie gelang auch der Nachweis von proPSA, hier (-2)proPSA, in höherer Konzentration im PCa-Gewebe als im BPH-Gewebe, wobei

Serumanalysen von PCa-Patienten für das (-2)proPSA einen Anteil von 25-95% am freien PSA, jedoch nur 6-19% des freien PSA bei BPH-Patienten zeigten (74).

Eine Vielzahl an Untersuchungen befasste sich mit der Frage, ob diese proPSA-Isoformen sowohl als proPSA-Summe (-7,-5,-4,-2proPSA) oder auch einzeln neue wichtige diagnostische Parameter zur besseren Diskriminierung zwischen PCa und BPH darstellen. Ebenfalls offen war diese Fragestellung in Bezug auf die Vorhersage von Stadium und Grading eines PCa mit Hilfe der verschiedenen proPSA-Formen.

Im Gegensatz zum (-4)proPSA und (-2)proPSA werden sowohl (-5) als auch (-7)proPSA durch das humane Kallikrein 2 (KLK2) aktiviert. Sie besitzen ähnliche biochemische Eigenschaften (74). Die Bedeutung der (-5,-7)proPSA-Form in der Detektion eines PCa und ihre Beziehung zu Tumorstadium und -grading waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen auf immunhistochemischer Ebene (99, 147). Unter Zuhilfenahme des monoklonalen (-5,-7)proPSA-Antikörpers (PS2P4464.4) der Fa. Beckman Coulter, Inc., San Diego, California, der zu Forschungszwecken zugelassen ist, wurde in den nachfolgend erwähnten Studien die Verteilung von (-5,-7)proPSA in Gewebedünnschnitten der Prostata untersucht. Veltri et al. (147) beschäftigten sich mit der Differenzierung benigner und maligner Epithelzellen der Prostatakarzinomdrüse bei 25 gebürtigen Japanern und 25 Japan-Amerikanern unter Zuhilfenahme dieses Biomarkers. Die Ergebnisse der spezifischen (-5,-7)proPSA-immunhistochemischen Färbung in Kombination mit dem beobachteten Grad der Zellkernalteration in den verschiedenen Geweben ergaben signifikante Unterschiede im Aufbau eines PCa zwischen den untersuchten Gruppen (147).

Parwani und Kollegen (99) verglichen die immunhistochemischen Eigenschaften des (-5,-7)proPSA-Antikörpers von insgesamt 74 Gewebeproben nicht hormonrefraktärer metastasierter PCa sowie Kontrollproben mit denen nach Zugabe von Antikörpern des (-2)proPSA, PSA sowie der PAP. Der (-5,-7)proPSA-Antikörper war in dieser Studie dem PSA und der PAP im Hinblick auf Detektion des metastasierten PCa überlegen und könnte nach Aussage der Autoren daher in Zukunft eine Rolle als immunhistochemischer Routineparameter einnehmen (99).

Tabarés et al. (139) untersuchten die Zusammensetzung der Isoformen des freien PSA mittels 2D-Elektrophorese und Western-Blot. Analysiert wurden Serumproben von Patienten mit sowie ohne Anhalt für PCa, Gewebeproben nach radikaler Prostatektomie mit benignen und malignen Anteilen sowie Seminalplasma eines gesunden Spenders. Zum Einsatz kam hier ein monoklonaler biotinylierter Maus-Antikörper Anti-proPSA

(Isoform -5,-7) der Fa. Roche Diagnostics, Deutschland. Es konnten hier letztendlich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der fPSA-Isoformen innerhalb der Gewebe und auch im Vergleich zwischen Gewebe und Seren gefunden werden, die eine Verbesserung der Prostatakarzinomdiagnostik zulassen (139).

5.4.1 (-2), (-4), (-5,-7)proPSA

Die Tabelle 11 gibt einen Überblick über alle Studien zu den verschiedenen proPSA-Isoformen. Unterschieden wurde hier nach Autor, beschriebener proPSA-Isoform, Anzahl untersuchter Patienten und dem Gesamt-PSA(tPSA)-Intervall.

Tabelle 11: Studien zu den verschiedenen proPSA-Isoformen

Assay proPSA	Autor	proPSA-Isoform	Pat. gesamt/ PCa	tPSA in µg/L
Beckman-Coulter	Catalona 2003 (15)	Summe (-2), (-4), (-5,-7)	1091/ 456	2-10
Beckman-Coulter	Mikolajczyk 2004 (72)	Summe (-2), (-4), (-5,-7)	380/ 238	4-10
Beckman-Coulter	Catalona 2004 (16)	Summe (-2), (-4), (-5,-7)	1091/ 456	2-4 4-10
Roche Diagnostics	Bangma 2004 (6)	(-5,-7)	431/ 146	0,9-10,2 1,45-64,8
Roche Diagnostics	Lein 2005 (55)	(-5,-7)	2055/ 1046	2-10

Die Firma Beckman Coulter, Inc., San Diego, USA entwickelte zu Forschungszwecken ein Assay zur Bestimmung der (-2), (-4), (-5,-7) proPSA-Formen im Serum.

Die Arbeitsgruppe um Catalona (15) berichtete 2003 über die Wertigkeit dieser proPSA-Formen zur PCa-Detektion im Vergleich zum fPSA und cPSA anhand der Untersuchung von 1091 Männern mit gesicherter Prostatahistologie. Im PSA-Bereich von 2-4, 2-6, 4-10 und 2-10 µg/L erbrachte der Quotient aus proPSA zu fPSA (%pPSA) die höchste Spezifität bezüglich der PCa-Detektion (15). Im PSA-Bereich 2-4 µg/L und einer

Sensitivität von 90% ersparte der %pPSA-Wert 19% unnötige Biopsien im Vergleich zu 10% beim %fPSA und 11% für das cPSA ($p < 0,001$). Ähnlich gute Resultate für %pPSA wurden in allen o.a. tPSA-Bereichen erzielt. Der Quotient %pPSA verbesserte hier signifikant die Spezifität der PCa-Detektion und reduzierte die Anzahl unnötiger Biopsien im tPSA Bereich 2-4 $\mu\text{g/L}$. Der Quotient des (-2)proPSA zum fPSA, welcher %(-2)proPSA/fPSA genannt wird, zeigte in diesem tPSA-Bereich die höchste Spezifität in der Erkennung eines PCa (15). Im Vergleich zum %fPSA und cPSA erreichte der Quotient %(-2)proPSA/fPSA die größte AUC der ROC-Kurve und die höhere Spezifität von 19% bei einer Sensitivität von 90%, war aber dem %pPSA nicht überlegen (15).

Mikolajczyk et al. (72) berichteten 2004 ebenfalls über die Wertigkeit der proPSA-Formen zur Detektion des PCa. Sie untersuchten 380 Patientenseren von Männern mit PCa oder biopsienegativem Befund im tPSA-Bereich 4-10 $\mu\text{g/L}$. Der Quotient aus der Summe der proPSA-Formen [(-2), (-4), (-5,-7)] und dem fPSA (%proPSA) hatte hier eine größere AUC der ROC-Kurve als %(-2)proPSA, fPSA und cPSA. Sowohl %(-2)proPSA als auch die Serumkonzentration von (-2)proPSA waren gleich effektiv in der PCa-Detektion im fPSA-Bereich $>25\%$, der allerdings mit einer geringeren PCa-Wahrscheinlichkeit verbunden ist. Mikolajczyk et al. (72) bezeichneten dies als den gegensätzlichen Charakter des proPSA, welches zwar eine Form des freien PSA darstellt, aber offensichtlich stark assoziiert ist mit dem Auftreten eines PCa.

Im Jahr 2004 berichteten Catalona et al. (16) über den Nutzen des proPSA zur Vorhersage des histologischen Gradings eines PCa anhand einer retrospektiven Analyse von 1091 Patientenseren. Obwohl Tumorstadium, Gleason-Score und Tumorstadium im tPSA-Bereich 2-4 $\mu\text{g/L}$ geringer waren als im Bereich 4-10 $\mu\text{g/L}$, ergab der Quotient %proPSA und speziell %(-2)proPSA hier die höchste Spezifität der PCa-Detektion. Insgesamt korrelierte in dieser Studie das proPSA mehr mit einem Gleason-Score ≥ 7 als mit organüberschreitendem Tumorwachstum. Im niedrigen tPSA-Bereich von 2-4 $\mu\text{g/L}$ konnten proPSA/fPSA aber auch %fPSA signifikant differenzieren zwischen Gleason-Score < 7 und Gleason-Score ≥ 7 ($n=29$). Hingegen trennten weder proPSA/fPSA noch %fPSA signifikant zwischen pT2- und pT3-Tumoren. Für den Bereich tPSA von 4-10 $\mu\text{g/L}$ besaßen allerdings beide Parameter keine diskriminatorische Kraft (16).

Insgesamt zeigten sich die Summe der beschriebenen proPSA-Isoformen als auch das (-2)proPSA allein als vielversprechende neue Marker zur Detektion vor allem aggressiver Formen des PCa

5.5 Bewertung des (-5,-7)proPSA

Ein Testprototyp-Assay zu Forschungszwecken der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, bestimmt die (-5,-7)proPSA-Form (38). Die Wertigkeit dieser proPSA-Form zur Detektion eines PCa und zur Differenzierung von Tumorstadium und Grading wurde bisher in 2 Studien untersucht (6, 55).

Bangma und Kollegen (6) berichteten 2004 über die Wertigkeit des (-5,-7)proPSA als potentiellen Serummarker sowohl zur Detektion als auch zum Grading eines PCa. Die Bestimmung des (-5,-7)proPSA erfolgte mittels eines Testprototyps (Roche® Diagnostics) an insgesamt 431 Patienten. Im ersten Teil der Studie erfolgte die Untersuchung des (-5,-7)proPSA bezüglich der Diskriminierung zwischen Patienten ohne Prostataerkrankung, Patienten mit BPH und PCa-Patienten. Alle Patienten erhielten eine mindestens 6-fache TRUS-gesteuerte Prostatastanzbiopsie. Die 431 Männer verteilten sich dann wie folgt in 3 Gruppen: Gruppe 1 mit 143 Männern ohne Anhalt für PCa oder BPH und einem tPSA von 0,9-9,3 µg/L, Gruppe 2 mit 142 Männern mit BPH und einem tPSA von 2,4-9,6 µg/L und einer Gruppe 3 mit 146 Männern mit PCa und einem tPSA von 1,4-10,2 µg/L.

Der tPSA-Wert konnte signifikant zwischen gesunden Probanden und BPH sowie zwischen Gesunden und PCa unterscheiden. Die Differenzierung zwischen BPH und PCa gelang nicht.

Der %fPSA Wert differierte signifikant zwischen allen beschriebenen Gruppen, d.h. er trennte signifikant zwischen Gesunden und BPH, zwischen Gesunden und PCa sowie zwischen BPH und PCa.

Das (-5,-7)proPSA trennte ebenfalls signifikant zwischen allen 3 Gruppen.

Der Quotient (-5,-7)proPSA/(f/tPSA), welcher dem (-5,-7)proPSA/(%fPSA) entspricht, konnte signifikant unterscheiden zwischen Gesunden und BPH sowie zwischen Gesunden und PCa. Eine Trennung zwischen BPH und PCa gelang nicht.

Zusammenfassend konnten tPSA, %fPSA, (-5,-7)proPSA sowie (-5,-7)proPSA/(%fPSA) immer zwischen gesunden Probanden und PCa-Patienten sowie in den meisten Fällen zwischen BPH und PCa unterscheiden (6).

Der zweite Teil der Studie analysierte den Wert des (-5,-7)proPSA zur Vorhersage des histologischen Gradings (Anderson-Grading) eines PCa an einer Gruppe von insgesamt 143 radikal prostatektomierten Männern (6). Weder das (-5,-7)proPSA noch der

Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ differierten zwischen den Patienten mit G1- (n=53), G2- (n=62) und G3-Tumoren (n=26). Das $(-5,-7)\text{proPSA}$ war damit in dieser Studie mit relativ wenigen Patienten nicht nutzbringend zur Differenzierung zwischen aggressiven und weniger aggressiven Formen eines PCa. Auch die Kombination des $(-5,-7)\text{proPSA}$ mit anderen Variablen erbrachte keine Verbesserung in der Diagnostik bzw. des Gradings. Ebenso ergab sich keine Korrelation zwischen $(-5,-7)\text{proPSA}$ und dem Tumorstadium eines PCa (6).

Insgesamt war in der Studie von Bangma und Kollegen (6) die Wertigkeit des $(-5,-7)\text{proPSA}$ bezüglich der PCa-Detektion gut, im Hinblick auf die Vorhersage der Tumordifferenzierung begrenzt.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Lein et al. (55) in einer großen Multicenter-Studie durch die retrospektive Analyse der Daten von 2055 Männern, über die 2005 berichtet wurde. Auch hier erfolgte die Bestimmung mittels des $(-5,-7)\text{proPSA}$ -Testprototyps (Roche[®] Diagnostics). Alle Patienten bekamen eine TRUS-gesteuerte Prostatastanziobiopsie, Vorerkrankungen seitens der Prostata waren nicht bekannt. Untersucht wurden insgesamt 1046 Männer mit PCa und 1009 Männer ohne Anhalt für PCa mit einer tPSA-Konzentration von 0,28-81 $\mu\text{g/L}$. Lediglich im tPSA-Bereich 4-10 $\mu\text{g/L}$ erreichte der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/f\text{PSA}$ nach ROC-Kurven-Analyse mit einer AUC von 0,67 eine größere diagnostische Validität als das tPSA (AUC: 0,53). Das $(-5,-7)\text{proPSA}/f\text{PSA}$ war aber dem $\%f\text{PSA}$ -Wert (AUC 0,69) in diesem tPSA-Bereich nicht überlegen. Sensitivität und Spezifität der PCa-Detektion wurden im Bereich tPSA 4-10 $\mu\text{g/L}$ ermittelt. Auch hier ergaben sich weder für das $(-5,-7)\text{proPSA}$ noch dessen Kombination mit anderen Variablen Vorteile im Vergleich zum $\%f\text{PSA}$. Eine Subanalyse einiger PCa-Patienten dieser Studie, welche radikal prostatektomiert wurden, zeigte keine Möglichkeit für das $(-5,-7)\text{proPSA}$ zwischen Gleason-Score <7 und ≥ 7 zu differenzieren (55).

Zusammenfassend konnten in beiden Studien weder das $(-5,-7)\text{proPSA}$ noch seine Kombination mit anderen Variablen entscheidend die Diskrimination zwischen PCa und BPH sowie die Vorhersage von Tumorstadium und -grading erhöhen (6, 55).

Die Bedeutung des $(-5,-7)\text{proPSA}$ innerhalb eines $\%f\text{PSA}$ -basierenden artifiziellen neuronalen Netzwerkes (ANN) zur Verbesserung der PCa-Diagnostik wurden durch Stephan et al. (136) untersucht. Das $(-5,-7)\text{proPSA}$ als einzelner Parameter zeigte dem $\%f\text{PSA}$ gegenüber keine verbesserte Spezifität. Allerdings konnte ein ANN nur mit den Parametern tPSA, proPSA und $\%f\text{PSA}$ im Bereich tPSA 4-10 $\mu\text{g/L}$ in einer Subpopulation eine vergleichbare AUC zum in der Routine verwendeten ProstataClass-ANN

(136) erzielen. Das ProstateClass-ANN enthält zusätzlich die Parameter Prostatavolumen und DRU (130).

Die beiden derzeit verfügbaren proPSA-Testsysteme der Fa. Beckman Coulter (Summe des (-2), (-4) und (-5,-7)proPSA) und der Fa. Roche mit dem (-5,-7)proPSA-Test zeigten bezüglich der Unterscheidung von aggressiven und weniger aggressiven PCa ähnliche Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Studie von Catalona et al. (16) mit dem kombinierten (-2)proPSA, (-4)proPSA und (-5,-7)proPSA-Assay und von Bangma et al. (6) mit der (-5,-7)proPSA-Form basierten auf relativ kleinen Untergruppen für Gleason-Score ≥ 7 - Tumore (n=64 im Bereich tPSA 2-10 $\mu\text{g/L}$) oder G3-Tumore (n=26).

Die hier vorliegende Studie wurde deshalb zur Bestimmung der Wertigkeit des (-5,-7)proPSA im Hinblick auf die präoperative Bestimmung von Tumorstadium und –grading an einer deutlich größeren Population (n=376) von Patienten mit einem PCa durchgeführt. Wie bereits aufgezeigt, verteilten sich die Patienten dieser Arbeit wie folgt: pT2 (n=270), pT3 (n=106), G1-2 (n=256), G3 (n=120) sowie Gleason-Score < 7 (n=151) und Gleason-Score ≥ 7 (n=225). In der eigenen Studie sowie in den Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Bangma (6) und Lein (55) wurde zur Detektion von (-5,-7)proPSA der Immunoassay der Fa. Roche verwendet.

Folgende Fragen aus der Aufgabenstellung waren mit hier vorliegender Studie zu beantworten: Bestimmung der Wertigkeit des (-5,-7)proPSA zur

- 1.) Vorhersage des endgültigen pathologischen Stadiums eines PCa,
- 2.) Differenzierung zwischen G1-, G2- und G3-PCa,
- 3.) Differenzierung zwischen Gleason-Score < 7 und Gleason-Score ≥ 7 ,
- 4.) Beziehung des (-5,-7)proPSA zu PSA, fPSA und %fPSA,
- 5.) Bedeutung des (-5,-7)proPSA bei %fPSA-Werten $< 10\%$.

Hierzu wurden die Daten von insgesamt 376 Patienten, die im Zeitraum zwischen 2001 und 2004 in der Klinik für Urologie der medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin wegen eines PCa radikal laparoskopisch prostatektomiert wurden, ausgewertet.

Das tPSA differierte in der eigenen Studie signifikant zwischen pT2/pT3 (p=0,008), zwischen G2/G3 (p=0,014) sowie zwischen Gleason-Score $< 7/\geq 7$ (p=0,004) in der tPSA Gruppe 1-25 $\mu\text{g/L}$, welche alle Patienten einschloss. In der Studie von Bangma et al. (6)

gelang mittels tPSA keine Unterscheidung zwischen G2- und G3-Tumoren oder G1- und G2-Tumoren, wohl aber eine signifikante Unterscheidung zwischen G1- und G3-Tumoren ($p=0,016$). Die deutlich geringere Probandenzahl in der Studie von Bangma et al. (6) kann bereits diese Unterschiede zur eigenen Arbeit bewirken.

Das %fPSA verbesserte in der eigenen Studie nur die Differenzierung zwischen Gleason-Score $<7/\geq 7$ in den Untergruppen 1-10 $\mu\text{g/L}$ tPSA ($p=0,033$), 4-10 $\mu\text{g/L}$ tPSA ($p=0,013$) und 1-25 $\mu\text{g/L}$ tPSA ($p=0,021$). Eine Unterscheidung zwischen pT2/pT3 oder G2/G3 war mit dem %fPSA hier nicht möglich. Bei Bangma (6) differierte der Wert %fPSA zwar signifikant zwischen Gesunden, BPH und PCa, konnte aber ebenfalls nicht zwischen den verschiedenen Grading-Stufen unterscheiden. Damit zeigte das %fPSA in beiden genannten Studien kein Potenzial, die Grading-Stufen zu unterscheiden, wohl aber zwischen Gleason-Score $<7/\geq 7$ -Patienten. Im Gegensatz dazu zeigte das (-5,-7)proPSA ein umgekehrtes Verhalten bezüglich der Signifikanzen zwischen G2/G3 und Gleason-Score $<7/\geq 7$ in der eigenen Auswertung. Während (-5,-7)proPSA zwischen G2- und G3-Tumoren unterschied ($p=0,008$), war dieses zwischen Gleason-Score $<7/\geq 7$ ($p=0,08$) Patienten nicht der Fall. Mögliche Ursachen für diese unterschiedlichen Daten zum %fPSA und (-5,-7)proPSA in Bezug auf die Bewertung der Tumoraggressivität mittels Grading oder dem Gleason-Score sind allerdings nicht ersichtlich.

Bei Bangma et al. (6) trennte das (-5,-7)proPSA ebenfalls nicht signifikant zwischen den verschiedenen Grading-Stufen. In der Studie von Lein et al. (55) konnte das (-5,-7)proPSA nicht zwischen pT2 und pT3 sowie zwischen Gleason-Score <7 und ≥ 7 unterscheiden. Das (-5,-7)proPSA als alleiniger Wert differierte in dieser Studie allerdings signifikant zwischen pT2- und pT3-Tumoren in der Gruppe der Patienten mit einem fPSA $<10\%$ ($p=0,02$) sowie in der Gesamtgruppe 1-25 $\mu\text{g/L}$ tPSA ($p=0,023$). Die hohe Patientenzahl kann hierfür allerdings bereits ursächlich für diese Signifikanz sein.

Der Bildung des Quotienten (-5,-7)proPSA/tPSA ergab keinen zusätzlichen Nutzen in Bezug auf die Differenzierung zwischen pT2/pT3, G2/G3 sowie Gleason-Score $<7/\geq 7$. Daten zu den beiden anderen Studien liegen dazu nicht vor.

Der Quotient (-5,-7)proPSA/fPSA wurde ebenfalls untersucht. Hier ergab sich jedoch bereits bezüglich der Differenzierung des Gleason-Scores $<7/\geq 7$ nach Berechnung der Median-Werte (Median Gleason-Score <7 : 0,4839, Median Gleason-Score ≥ 7 : 0,3724) und des p-Wertes ($p=0,2$) keine statistische Signifikanz. Möglicherweise wird dieser Quotient unter Zuhilfenahme einer anderen proPSA - Form Bedeutung in Bezug auf die Vorhersage von Tumorstadium, -grading und Gleason-Score eines PCa erlangen.

Der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ zeigte in den eigenen Untersuchungen von allen hier vorgestellten Parametern das größte diskriminatorische Potential. Die Variable $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ unterschied zwischen G2- und G3- ($p=0,004$) sowie zwischen pT2- und pT3-Tumoren ($p<0,0001$) im Bereich tPSA 1-25 $\mu\text{g/L}$. Die Differenzierung zwischen Gleason-Score <7 und ≥ 7 gelang in allen getesteten tPSA-Untergruppen (1-10 $\mu\text{g/L}$ tPSA $p=0,014$, 4-10 $\mu\text{g/L}$ tPSA $p=0,007$, 1-25 $\mu\text{g/L}$ tPSA $p=0,001$) sowie in der Gruppe $\%f\text{PSA}<10\%$ ($p=0,043$). In der Untergruppe $\%f\text{PSA}<10\%$ differiert dieser Quotient zusätzlich zwischen pT2- und pT3-Tumoren ($p=0,002$), in der Untergruppe 4-10 $\mu\text{g/L}$ tPSA zwischen G2 und G3 ($p=0,009$). Der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ hatte somit in allen untersuchten tPSA-Untergruppen wie auch im Bereich $\%f\text{PSA}<10\%$ zusätzlichen Wert in der Detektion vor allem aggressiver Formen des PCa. In der Untersuchung von Bangma et al. (6) zeigte der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ an der dort verwendeten deutlich geringeren Patientenzahl dagegen kein Potential zwischen G1, G2 und G3 zu unterscheiden. In der Studie von Lein et al. (55) konnte kein Quotient des proPSA eine signifikante Diskriminationsverbesserung aufzeigen. Lediglich bei der Differenzierung zwischen BPH und PCa konnte die Wertigkeit des proPSA gezeigt werden (55). Im Bereich tPSA 2-4 $\mu\text{g/L}$ besaß die Variable $\%f\text{PSA}$ die größte diskriminatorische Kraft zur Differenzierung zwischen BPH und PCa, gefolgt von tPSA und $(-5,-7)\text{proPSA}/f\text{PSA}$ (55). Im Bereich tPSA 4-10 $\mu\text{g/L}$ erreichte ebenfalls $\%f\text{PSA}$ den höchsten Wert der AUC, gefolgt von den Quotienten $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ und $(-5,-7)\text{proPSA}/t\text{PSA}$. Eine geringe Patientenzahl (6) sowie eine heterogene Gruppenverteilung innerhalb der Multicenterstudie von Lein et al. (55) könnten verantwortlich dafür sein, dass in den vorhergehenden Studien der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ bezüglich seiner diskriminatorischen Kraft zur Erkennung aggressiver Tumoren unterbewertet wurde.

Zusammenfassend lassen sich die in der Aufgabenstellung gestellten Fragen zu den 5 Punkten wie folgt beantworten.

1.) Vorhersage des endgültigen pathologischen Stadiums eines PCa:

Das $(-5,-7)\text{proPSA}$ allein und der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ unterschieden signifikant zwischen den Tumorstadien pT2 und pT3 im Bereich tPSA 1-25 $\mu\text{g/L}$. Im gleichen Ausmaß jedoch konnte das tPSA selbst diese Differenzierung im genannten tPSA-Intervall nachweisen. In den anderen tPSA Bereichen 1-10 und 4-10 $\mu\text{g/L}$ waren weder tPSA, $\%f\text{PSA}$ oder $(-5,-7)\text{proPSA}$ noch ein Quotient dieser Marker in der Lage, zwischen pT2 und pT3 zu unterscheiden. Obwohl der Quotient $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ in

den verschiedenen Modellen der logistischen Regression der Parameter mit der besten Aussagekraft war und auch eine geringe Verbesserung der AUC mit Hilfe der logistischen Regression erzielt wurde, ist eine verbesserte Vorhersage des pathologischen Tumorstadiums mit Hilfe des (-5,-7)proPSA in einem definierten tPSA Bereich trotzdem eher fraglich.

2.) Differenzierung zwischen G1-, G2- und G3-PCa

Während das tPSA nur im tPSA Gesamtbereich 1-25 µg/L zwischen G2 und G3 trennen konnte, ist das %fPSA in keinem tPSA Bereich dazu in der Lage. Das (-5,-7)proPSA allein unterschied nur signifikant zwischen G1-2- und G3-Tumoren im Bereich tPSA 1-25 µg/L, der Quotient (-5,-7)proPSA/(%fPSA) zeigte hingegen in allen tPSA Bereichen die Fähigkeit, aggressive Tumoren von nicht aggressiven zu diskriminieren. Dieses ist eines der wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit.

3.) Differenzierung zwischen Gleason-Score <7 und Gleason-Score ≥7

Das (-5,-7)proPSA differierte nicht zwischen Gleason-Score <7 und ≥7.

Der Quotient (-5,-7)proPSA/(%fPSA) hingegen differierte zwischen Gleason-Score <7 und ≥7 in allen untersuchten tPSA-Bereichen (1-10 µg/L, 4-10 µg/L, 1-25 µg/L). Dieses Ergebnisse bestätigen die analogen Erkenntnisse bei der Diskrimination zwischen G2 und G3 durch den Wert (-5,-7)proPSA/(%fPSA). Der Wert tPSA differierte nur signifikant zwischen Gleason-Score <7 und ≥7 im Bereich tPSA 1-25 µg/L. Das %fPSA zeigte im Gegensatz zu den nicht signifikanten Unterschieden beim Grading jetzt in allen untersuchten tPSA-Bereichen 1-10 µg/L, 4-10 µg/L und 1-25 µg/L die Fähigkeit, zwischen Gleason-Score <7 und ≥7 zu differenzieren. Damit sind das %fPSA und dessen Quotient mit dem (-5,-7)proPSA die einzigen Parameter, die unabhängig vom jeweiligen tPSA Bereich immer zwischen Gleason-Score <7 und ≥7 unterscheiden können. Diese Erkenntnis an einer relativ großen Patientengruppe widerlegt die bisherigen Ergebnisse der beiden Arbeitsgruppen um Bangma (6) und Lein (55), wo (-5,-7)proPSA oder seine Quotienten nicht zwischen aggressiven und nicht aggressiven PCa unterschieden.

4.) Korrelationen des (-5,-7)proPSA zum PSA, fPSA und %fPSA

Die Variable (-5,-7)proPSA korrelierte signifikant ($p > 0,0001$) in allen untersuchten tPSA-Bereichen zum tPSA (r_s 0,24-0,53).

Die Variable (-5,-7)proPSA war in allen untersuchten tPSA-Bereichen stark korreliert zum fPSA (r_s 0,715-0,750; $p > 0,0001$).

5.) Bedeutung des (-5,-7)proPSA bei %fPSA-Werten <10%

Das (-5,-7)proPSA allein war lediglich in der Lage, im Bereich %fPSA <10% zwischen pT2- und pT3-Tumoren zu diskriminieren.

Im Bereich %fPSA <10% hatte die Variable (-5,-7)proPSA nur als (-5,-7)proPSA/(%fPSA) weitere Diskriminierungskraft. Hier differenzierte dieser Quotient dann bereits zwischen einem PCa mit Gleason-Score <7/≥7 sowie zwischen pT2- und pT3-Tumoren.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lein et al. (55) wurde keine zusätzliche diskriminatorische Fähigkeit zur Tumordetektion für (-5,-7)proPSA allein oder für den Quotienten (-5,-7)proPSA/tPSA gefunden. Auch der Quotient (-5,-7)proPSA/fPSA wurde einer statistischen Analyse unterzogen. Hier ergaben bereits die Berechnungen der Median-Werte bezüglich Differenzierung zwischen Gleason-Score <7/≥7 und des p-Wertes keine statistische Signifikanz. Möglicherweise erlangt ein Quotient aus einer der anderen proPSA-Formen mit fPSA in Zukunft größere Bedeutung im Hinblick auf Vorhersage von Tumorstadium, -grading und Gleason-Score eines PCa.

Lediglich der Wert (-5,-7)proPSA/(%fPSA) zeigte in dieser Studie signifikant zusätzlichen diskriminatorischen Wert zur PCa-Erkennung verglichen mit tPSA oder %fPSA.

Die Punkte 1 bis 5 zeigen zusammenfassend, dass das (-5,-7)proPSA allein nur einen begrenzten Wert in Bezug auf Vorhersage von Tumorstadium und -grading hat.

Die beste Aussagekraft zur Vorhersage von Tumorstadium und -grading sowie insbesondere der Tumoraggressivität mittels des Gleason-Score besteht nach den Ergebnissen dieser Arbeit für den Quotienten (-5,-7)proPSA/(%fPSA).

5.6 Bewertung und Ausblicke

Der Einsatz der verschiedenen proPSA-Formen zeigte in der Studie von Bangma et al. (6) seine diagnostische Stärke bei der Detektion des PCa. Aus analytischer Sicht ist es nachvollziehbar, dass es auf Grund des relativ differenten Auftretens von proPSA im Gewebe und in Flüssigkeiten bei Auftreten eines Malignoms zu sehr speziellen Veränderungen zwischen den verschiedenen metabolischen Komponenten des PSA kommt. ProPSA wurde nachgewiesen in Prostatagewebe, im Serum und in der Samenflüssigkeit (102). Zum derzeitigen Zeitpunkt ist allerdings der genaue Mechanismus von Produktion, Aktivierung und Clearance der verschiedenen Komponenten des PSA noch unklar. Mit adäquaten Enzymimmunoassays könnten diese Veränderungen im Serum detektiert werden und karzinomspezifischere Bestimmungen folgen. Eine wesentliche Voraussetzung der bisherigen Studien zum (-5,-7)proPSA ist das Vorhandensein des Immunoassays der Fa. Roche zur Detektion dieser speziellen proPSA-Isoform. Dieser Test ist jedoch nicht standardisiert und es existieren bisher nur begrenzte Informationen zu seiner Sensitivität. Die Werte des (-5,-7)proPSA werden in willkürlich festgelegten Einheiten gemessen und sind damit nicht direkt mit der Konzentration des fPSA zu vergleichen.

Parallel zu den Resultaten der multizentrischen Studie von Lein und Kollegen (55) zeigen die eigenen Ergebnisse, dass (-5,-7)proPSA allein nicht den bereits existierenden Variablen tPSA und %fPSA überlegen ist zur präoperativen Differenzierung von Tumorstadium und -grading eines PCa. Der Quotient des (-5,-7)proPSA zum %fPSA war allerdings dem %fPSA insofern bei Abgrenzung aggressiver Tumoren überlegen, da er in allen tPSA-Bereichen nicht nur zwischen Patienten mit Gleason-Score <7 und ≥ 7 , sondern auch zwischen G2- und G3-PCa unterschied. Andere proPSA-Isoformen sollten in Zukunft im Hinblick besonders auf diese Differenzierung untersucht werden und könnten dann als zusätzliche Staging- und Gradingparameter klinisch wertvoll werden.

Die aktuelle Bewertung der derzeit genutzten Serummarker für die Detektion des PCa lässt folgende Schlussfolgerungen zu.

Das tPSA ist wegen seiner geringen Spezifität der PCa-Detektion in Deutschland keine anerkannte Kassenleistung. Das %fPSA ist der zzt. einzige weitere Wert, der die Spezifität der PCa-Detektion im Bereich tPSA 4-10 $\mu\text{g/L}$ signifikant erhöht. Dieser Wert indiziert im klinischen Gebrauch bei Unterschreiten eines bestimmten Grenzwertes

zusammen mit dem tPSA eine TRUS-gesteuerte Biopsie/Rebiopsie der Prostata. Um Bestandteil eines Früherkennungsprogramms des PCa zu werden, muss der gemessene Wert in einem genügend hohen Maße spezifisch sein. Die Erkrankung sollte unter Vermeidung weiterer unnötiger Diagnostik am Patienten zu diagnostizieren sein. Dies ist zzt. weder für tPSA noch für %fPSA in genügendem Maße gegeben. Nach Analyse der bereits vorhandenen Studien hat auch das (-5,-7)proPSA diese Erwartungen bezüglich einer signifikant verbesserten PCa-Detektion nicht bzw. noch nicht erfüllt. Eine endgültige Bewertung kann aber erst nach größeren prospektiven Studien unter Einbeziehung aller dann messbaren proPSA-Formen erfolgen.

Es ist allgemein anerkannt, dass das tPSA im Serum nicht nur seinen Wert in der PCa-Diagnostik, sondern vor allem auch in der Prognoseabschätzung dieses Tumorerleidens hat (103). Das tPSA korreliert eng mit dem pathologischen Grad des PCa und dem Risiko der Tumorprogression. Zusätzlich ist das tPSA der wichtigste Faktor zur Vorhersage eines Tumorrezidivs nach Behandlung des PCa. Desweiteren spielt die Höhe des tPSA in der Therapieplanung eine Rolle. Patienten mit einem sehr hohen tPSA-Wert von beispielsweise $>20 \mu\text{g/L}$ haben ein vergleichsweise sehr hohes Risiko, an einem bereits organüberschreitendem PCa erkrankt zu sein. Dagegen scheint der Wert des (-5,-7)proPSA zur weiteren Therapieplanung nach erfolgter tumorpositiver Prostatastanziobiopsie zzt. begrenzt. Mit einer besseren Zuordnung dieses Wertes zu Tumorstadium und -grading als prognostischer Parameter wäre die Auswahl der weiteren Therapie („watchful waiting“ versus operativ) gegebenenfalls besser möglich. Die bereits erwähnte Suche nach weiteren proPSA-Isoformen sowie ihre Messung im Serum oder auch Gewebe kann ein weiterer Ansatz für zukünftige Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

In Deutschland werden derzeit jährlich etwa 48.650 PCa diagnostiziert. So ist die Prostata mit 22,3% die häufigste Lokalisation bösartiger Neubildungen beim Mann. Das PSA ist zzt. der mit Abstand bedeutendste Tumormarker der urologischen Onkologie in Bezug auf Früherkennung, Therapie und Verlauf des PCa. Der große Nachteil des PSA-Wertes ist sein Mangel an Spezifität. Das PSA besitzt im Bereich zwischen 4,0–10 µg/L eine unzureichende Spezifität. Das oft synchrone Auftreten von BPH und Prostatitis oder auch PCa, verbunden mit der relativ hohen Rate falsch-positiver bzw. falsch-negativer PSA-Werte im Serum führte zur Entwicklung weiterer Konzepte zur Spezifitätsverbesserung wie der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit, PSA-Verdopplungszeit oder auch der PSA-Dichte. Die Erwartung, dass diese Verfahren die Aussagekraft des tPSA-Wertes signifikant erhöhen, hat sich jedoch nur teilweise erfüllt.

Zum heutigen Zeitpunkt ist präoperativ lediglich der %fPSA-Wert zusätzlich zum tPSA als klinischer Routineparameter zur besseren Differenzierung zwischen einem PCa und einer BPH geeignet. Jeder neue Parameter zur Prostatakarzinomerkenung muss im Vergleich zum %fPSA im Hinblick auf die Verbesserung der Spezifität zur Tumordetektion betrachtet werden.

Intensive Erforschungen des PSA konnten zeigen, dass das PSA sowohl im Plasma als auch in der Seminalflüssigkeit aus einer heterogenen Mischung verschiedener freier und gebundener PSA-Subfraktionen besteht. Zusätzlich besteht auch die freie Fraktion des PSA aus weiteren verschiedenen molekularen Formen. In zahlreichen präklinischen Studien gelang mittlerweile der Nachweis potentiell karzinomspezifischer bzw. BPH-spezifischer Varianten der freien Fraktion des PSA.

Die Einführung kombinierter (-2) proPSA, (-4)proPSA und (-5,-7)proPSA-Assays als neue Marker zur präoperativen Tumordetektion hatte eine Reihe an Untersuchungen zur Bestimmung ihrer Wertigkeit in Bezug auf die Früherkennung von vor allem aggressiven Formen des PCa zur Folge.

Die vorliegende Arbeit diente der Bestimmung der präoperativen diagnostischen Wertigkeit des (-5,-7)proPSA und seiner Quotienten mit tPSA und fPSA zur Differenzierung von Tumorstadium und -grading.

Hierzu wurden die Daten von 376 prostatektomierten Patienten aus der Klinik für Urologie der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin ausgewertet.

Zusammenfassend demonstrierte diese Studie die verbesserten Möglichkeiten des Quotienten $(-5,-7)\text{proPSA}/(\%f\text{PSA})$ in der Unterscheidung zwischen aggressiven von weniger aggressiven Formen des PCa.

Obwohl die Bestimmung des $(-5,-7)\text{proPSA}$ eine begrenzte Wertigkeit in Bezug auf die Differenzierung zwischen dem PCa und nichtmalignen Prostataerkrankungen hat, zeigte dieser Serummarker in dieser Studie die Möglichkeit zur verbesserten Vorhersage der Aggressivität eines PCa.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Ahyai,S.A., Graefen,M., Steuber,T., Haese,A., Schlomm,T., Walz,J., Kollermann,J., Briganti,A., Zacharias,M., Friedrich,M.G., Karakiewicz,P.I., Montorsi,F., Huland,H. and Chun,F.K. Contemporary Prostate Cancer Prevalence among T1c Biopsy-Referred Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter, *Eur.Urol.* 2008 Apr; 53(4): 750-7, 2007.
- 2 Allard,W.J., Zhou,Z. and Yeung,K.K. Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate-specific antigen in serum, *Clin.Chem.*, 44: 1216-1223, 1998.
- 3 Anderson,J.R., Strickland,D., Corbin,D., Byrnes,J.A. and Zweiback,E. Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen, *Urology*, 46: 54-57, 1995.
- 4 Balk,S.P., Ko,Y.J. and Bubley,G.J. Biology of prostate-specific antigen, *J.Clin.Oncol.*, 21: 383-391, 2003.
- 5 Bangma,C.H., Kranse,R., Blijenberg,B.G. and Schröder,F.H. The free-to-total serum prostate specific antigen ratio for staging prostate carcinoma, *J.Urol.*, 157: 544-547, 1997.
- 6 Bangma,C.H., Wildhagen,M.F., Yurdakul,G., Schroder,F.H. and Blijenberg,B.G. The value of (-7, -5)pro-prostate-specific antigen and human kallikrein-2 as serum markers for grading prostate cancer, *BJU.Int.*, 93: 720-724, 2004.
- 7 Beduschi,M.C. and Oesterling,J.E. Percent free prostate-specific antigen: the next frontier in prostate-specific antigen testing, *Urology*, 51: 98-109, 1998.
- 8 Benson,M.C., Whang,I.S., Pantuck,A., Ring,K., Kaplan,S.A., Olsson,C.A. and Cooner,W.H. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer, *J.Urol.*, 147: 815-816, 1992.
- 9 Berger,A.P., Deibl,M., Strasak,A., Bektic,J., Pelzer,A.E., Klocker,H., Steiner,H., Fritsche,G., Bartsch,G. and Horninger,W. Large-scale study of clinical impact of PSA velocity: long-term PSA kinetics as method of differentiating men with from those without prostate cancer, *Urology*, 69: 134-138, 2007.
- 10 Brawer,M.K., Chetner,M.P., Beatie,J., Buchner,D.M., Vessella,R.L. and Lange,P.H. Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen, *J.Urol.*, 147: 841-845, 1992.
- 11 Brawer,M.K., Meyer,G.E., Letran,J.L., Bankson,E.R., Morris,D.L., Yeung,K.K. and Allard,W.J. Measurement of complexed PSA improves specificity for early detection of prostate cancer, *Urology*, 52: 372-378, 1998.
- 12 Cao Y. Anti-thrombin is expressed in the benign prostatic epithelium and in prostate cancer and is capable of forming complexes with prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2, *Am.J.Clin.Pathol.*, 161: 2053-2063, 2002.

- 13 Carter,H.B., Partin,A.W., Luderer,A.A., Metter,E.J., Landis,P., Chan,D.W., Fozard,J.L. and Pearson,J.D. Percentage of free prostate-specific antigen in sera predicts aggressiveness of prostate cancer a decade before diagnosis, *Urology*, *49*: 379-384, 1997.
- 14 Carter,H.B., Pearson,J.D., Metter,E.J., Brant,L.J., Chan,D.W., Andres,R., Fozard,J.L. and Walsh,P.C. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease, *JAMA*, *267*: 2215-2220, 1992.
- 15 Catalona,W.J., Bartsch,G., Rittenhouse,H.G., Evans,C.L., Linton,H.J., Amirkhan,A., Horninger,W., Klocker,H. and Mikolajczyk,S.D. Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml, *J.Urol.*, *170*: 2181-2185, 2003.
- 16 Catalona,W.J., Bartsch,G., Rittenhouse,H.G., Evans,C.L., Linton,H.J., Horninger,W., Klocker,H. and Mikolajczyk,S.D. Serum pro-prostate specific antigen preferentially detects aggressive prostate cancers in men with 2 to 4 ng/ml prostate specific antigen, *J.Urol.*, *171*: 2239-2244, 2004.
- 17 Catalona,W.J., Partin,A.W., Finlay,J.A., Chan,D.W., Rittenhouse,H.G., Wolfert,R.L. and Woodrum,D.L. Use of percentage of free prostate-specific antigen to identify men at high risk of prostate cancer when PSA levels are 2.51 to 4 ng/mL and digital rectal examination is not suspicious for prostate cancer: an alternative model, *Urology*, *54*: 220-224, 1999.
- 18 Catalona,W.J., Partin,A.W., Slawin,K.M., Brawer,M.K., Flanigan,R.C., Patel,A., Richie,J.P., deKernion,J.B., Walsh,P.C., Scardino,P.T., Lange,P.H., Subong,E.N., Parson,R.E., Gasior,G.H., Loveland,K.G. and Southwick,P.C. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial, *JAMA*, *279*: 1542-1547, 1998.
- 19 Catalona,W.J., Richie,J.P., Ahmann,F.R., Hudson,M.A., Scardino,P.T., Flanigan,R.C., deKernion,J.B., Ratliff,T.L., Kavoussi,L.R. and Dalkin,B.L. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men, *J.Urol.*, *151*: 1283-1290, 1994.
- 20 Catalona,W.J., Richie,J.P., deKernion,J.B., Ahmann,F.R., Ratliff,T.L., Dalkin,B.L., Kavoussi,L.R., MacFarlane,M.T. and Southwick,P.C. Comparison of prostate specific antigen concentration versus prostate specific antigen density in the early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves, *J.Urol.*, *152*: 2031-2036, 1994.
- 21 Catalona,W.J., Smith,D.S. and Ornstein,D.K. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements, *JAMA*, *277*: 1452-1455, 1997.
- 22 Catalona,W.J., Smith,D.S., Ratliff,T.L., Dodds,K.M., Coplen,D.E., Yuan,J.J., Petros,J.A. and Andriole,G.L. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer, *N.Engl.J.Med.*, *324*: 1156-1161, 1991.
- 23 Catalona,W.J., Smith,D.S., Wolfert,R.L., Wang,T.J., Rittenhouse,H.G., Ratliff,T.L. and Nadler,R.B. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening, *JAMA*, *274*: 1214-1220, 1995.

- 24 Christensson,A., Björk,T., Nilsson,O., Dahlen,U., Matikainen,M.T., Cockett,A.T., Abrahamsson,P.A. and Lilja,H. Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer, *J.Urol.*, *150*: 100-105, 1993.
- 25 Ciatto,S., Bonardi,R., Lombardi,C., Zappa,M., Gervasi,G. and Cappelli,G. Analysis of PSA velocity in 1666 healthy subjects undergoing total PSA determination at two consecutive screening rounds, *Int.J.Biol.Markers*, *17*: 79-83, 2002.
- 26 Clements,J.A. and Mukhtar,A. Glandular kallikreins and prostate-specific antigen are expressed in the human endometrium, *J.Clin.Endocrinol.Metab*, *78*: 1536-1539, 1994.
- 27 Elgamal,A.A., Cornillie,F.J., Van Poppel,H.P., Van de Voorde,W.M., McCabe,R. and Baert,L.V. Free-to-total prostate specific antigen ratio as a single test for detection of significant stage T1c prostate cancer, *J.Urol.*, *156*: 1042-1047, 1996.
- 28 Fang J. PSA Velocity for assessing prostate cancer risk in men with PSA levels between 2.0 and 4.0 ng/ml, *Urology*, *59*: 889-893, 2002.
- 29 Finne,P., Zhang,W.M., Auvinen,A., Leinonen,J., Maattanen,L., Rannikko,S., Tammela,T.L. and Stenman,U.H. Use of the complex between prostate specific antigen and alpha 1-protease inhibitor for screening prostate cancer, *J.Urol.*, *164*: 1956-1960, 2000.
- 30 Frazier,H.A., Humphrey,P.A., Burchette,J.L. and Paulson,D.F. Immunoreactive prostatic specific antigen in male periurethral glands, *J.Urol*, *147*: 246-248, 1992.
- 31 Gann,P.H., Hennekens,C.H. and Stampfer,M.J. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer, *JAMA*, *273*: 289-294, 1995.
- 32 Guess,H.A., Heyse,J.F. and Gormley,G.J. The effect of finasteride on prostate-specific antigen in men with benign prostatic hyperplasia, *Prostate*, *22*: 31-37, 1993.
- 33 Haese,A., Graefen,M., Noldus,J., Hammerer,P., Huland,E. and Huland,H. Prostatic volume and ratio of free-to-total prostate specific antigen in patients with prostatic cancer or benign prostatic hyperplasia, *J.Urol.*, *158*: 2188-2192, 1997.
- 34 Haese,A., Noldus,J., Steuber,T., Huland,H. and Lilja,H. [Isoforms of free prostate-specific antigen] Isoformen des freien prostataspezifischen Antigens, *Urologe A*, *43*: 675-679, 2004.
- 35 Hammerer,P.G., Kattan,M.W., Mottet,N. and Prayer-Galetti,T. Using prostate-specific antigen screening and nomograms to assess risk and predict outcomes in the management of prostate cancer, *BJU.Int.*, *98*: 11-19, 2006.
- 36 Hara,M., Koyanagi,Y., Inoue,T. and Fukuyama,T. Some physico-chemical characteristics of " -seminoprotein", an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion, *Nippon Hoigaku Zasshi*, *25*: 322-324, 1971.
- 37 Herschman,J.D., Smith,D.S. and Catalona,W.J. Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations, *Urology*, *50*: 239-243, 1997.

- 38 Hoesel,W., Peter,J. and Hübel-Parajsz,C. Development and evaluation of an ELISA for the measurement of proPSA forms in sera, *Anticancer Res.*, 22: 529, 2002.
- 39 Horninger,W., Volgger,H., Rogatsch,H., Strohmeyer,D., Steiner,H., Hobisch,A., Klocker,H. and Bartsch,G. Predictive value of total and percent free prostate specific antigen in high grade prostatic intraepithelial neoplasia lesions: results of the tyrol prostate specific antigen screening project, *J.Urol.*, 165: 1143-1145, 2001.
- 40 Irani,J., Millet,C., Levillain,P., Dore,B., Begon,F. and Aubert,J. Serum-to-urinary prostate specific antigen ratio: its impact in distinguishing prostate cancer when serum prostate specific antigen level is 4 to 10 ng./ml, *J.Urol.*, 157: 185-188, 1997.
- 41 Jemal,A., Siegel,R., Ward,E., Murray,T., Xu,J. and Thun,M.J. Cancer statistics, 2007, *CA Cancer J.Clin.*, 57: 43-66, 2007.
- 42 Jung,K., Brux,B., Lein,M., Knabich,A., Sinha,P., Rudolph,B., Schnorr,D. and Loening,S.A. Determination of alpha1-antichymotrypsin-PSA complex in serum does not improve the differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer compared with total PSA and percent free PSA, *Urology*, 53: 1160-1167, 1999.
- 43 Jung,K., Elgeti,U., Lein,M., Brux,B., Sinha,P., Rudolph,B., Hauptmann,S., Schnorr,D. and Loening,S.A. Ratio of free or complexed prostate-specific antigen (PSA) to total PSA: which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer?, *Clin.Chem.*, 46: 55-62, 2000.
- 44 Jung,K., Meyer,A., Lein,M., Rudolph,B., Schnorr,D. and Loening,S. Ratio of free to total prostate specific antigen in serum cannot distinguish patients with prostate cancer from those with chronic inflammation of the prostate, *J.Urol.*, 159: 1595-1598, 1998.
- 45 Jung,K., Stephan,C., Elgeti,U., Lein,M., Brux,B., Kristiansen,G., Rudolph,B., Hauptmann,S., Schnorr,D. and Loening,S.A. Molecular forms of prostate-specific antigen in serum with concentrations of total prostate-specific antigen <4 µg/l - are they useful tools for early detection and screening of prostate cancer?, *Int.J.Cancer*, 93: 759-765, 2001.
- 46 Jung,K., Stephan,C., Lein,M., Henke,W., Schnorr,D., Brux,B., Schürenkämper,P. and Loening,S.A. Analytical performance and clinical validity of two free prostate-specific antigen assays compared, *Clin.Chem.*, 42: 1026-1033, 1996.
- 47 Kairisto,V. and Poola,A. Software for illustrative presentation of basic clinical characteristics of laboratory tests - GraphROC for Windows, *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, 55(Suppl 222): 43-60, 1995.
- 48 Kalish,J., Cooner,W.H. and Graham,S.D., Jr. Serum PSA adjusted for volume of transition zone (PSAT) is more accurate than PSA adjusted for total gland volume (PSAD) in detecting adenocarcinoma of the prostate, *Urology*, 43: 601-606, 1994.
- 49 Kirkali,Z., Kirkali,G. and Esen,A. Effect of ejaculation on prostate-specific antigen levels in normal men, *Eur.Urol*, 27: 292-294, 1995.

- 50 Kuriyama,M., Wang,M.C., Papsidero,L.D., Killian,C.S., Shimano,T., Valenzuela,L., Nishiura,T., Murphy,G.P. and Chu,T.M. Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay, *Cancer Res.*, *40*: 4658-4662, 1980.
- 51 Labrie,F., Dupont,A., Suburu,R., Cusan,L., Tremblay,M., Gomez,J.L. and Emond,J. Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer, *J.Urol.*, *147*: 846-851, 1992.
- 52 Lee,C.T. and Scardino,P.T. Percent free Prostate-specific antigen for first-time prostate biopsy, *Urology*, *57*: 594-598, 2001.
- 53 Lein,M., Koenig,F., Jung,K., McGovern,F.J., Skates,S.J., Schnorr,D. and Loening,S.A. The percentage of free prostate specific antigen is an age-independent tumour marker for prostate cancer: establishment of reference ranges in a large population of healthy men, *Br.J.Urol.*, *82*: 231-236, 1998.
- 54 Lein,M., Kwiatkowski,M., Semjonow,A., Luboldt,H.J., Hammerer,P., Stephan,C., Klevecka,V., Taymoorian,K., Schnorr,D., Recker,F., Loening,S.A. and Jung,K. A multicenter clinical trial on the use of complexed prostate specific antigen in low prostate specific antigen concentrations, *J.Urol.*, *170*: 1175-1179, 2003.
- 55 Lein,M., Semjonow,A., Graefen,M., Kwiatkowski,M., Abramjuk,C., Stephan,C., Haese,A., Chun,F., Schnorr,D., Loening,S.A. and Jung,K. A multicenter clinical trial on the use of (-5, -7) pro prostate specific antigen, *J.Urol.*, *174*: 2150-2153, 2005.
- 56 Leinonen,J., Lövgren,T., Vornanen,T. and Stenman,U.H. Double-label time-resolved immunofluorometric assay of prostate-specific antigen and of its complex with alpha 1-antichymotrypsin, *Clin.Chem.*, *39*: 2098-2103, 1993.
- 57 Leinonen,J., Zhang,W.M. and Stenman,U.H. Complex formation between PSA isoenzymes and protease inhibitors, *J.Urol.*, *155*: 1099-1103, 1996.
- 58 Lerner,S.E., Jacobsen,S.J., Lilja,H., Bergstralh,E.J., Ransom,J., Klee,G.G., Piironen,T., Blute,M.L., Lieber,M.M., Zincke,H., Pettersson,K., Peterson,D. and Oesterling,J.E. Free, complexed, and total serum prostate-specific antigen concentrations and their proportions in predicting stage, grade, and deoxyribonucleic acid ploidy in patients with adenocarcinoma of the prostate, *Urology*, *48*: 240-248, 1996.
- 59 Levesque,M., Hu,H., D'Costa,M. and Diamandis,E.P. Prostate-specific antigen expression by various tumors, *J.Clin Lab Anal.*, *9*: 123-128, 1995.
- 60 Li,T.S. and Beling,C.G. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma, *Fertil.Steril.*, *24*: 134-144, 1973.
- 61 Lilja,H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein, *J.Clin.Invest*, *76*: 1899-1903, 1985.
- 62 Lilja,H. Regulation of the enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with cellular protease inhibitors in prostate cancer, *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, *55 (Suppl 220)*: 47-56, 1995.

- 63 Lilja,H., Christensson,A., Dahlen,U., Matikainen,M.T., Nilsson,O., Pettersson,K. and Lövgren,T. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin, *Clin.Chem.*, *37*: 1618-1625, 1991.
- 64 Lilja,H., Haese,A., Björk,T., Friedrich,M.G., Piironen,T., Pettersson,K., Huland,E. and Huland,H. Significance and metabolism of complexed and noncomplexed prostate specific antigen forms, and human glandular kallikrein 2 in clinically localized prostate cancer before and after radical prostatectomy, *J.Urol.*, *162*: 2029-2034, 1999.
- 65 Linton,H.J., Marks,L.S., Millar,L.S., Knott,C.L., Rittenhouse,H.G. and Mikolajczyk,S.D. Benign prostate-specific antigen (BPSA) in serum is increased in benign prostate disease, *Clin.Chem.*, *49*: 253-259, 2003.
- 66 Littrup,P.J., Kane,R.A., Mettlin,C.J., Murphy,G.P., Lee,F., Toi,A., Badalament,R. and Babaian,R. Cost-effective prostate cancer detection. Reduction of low-yield biopsies. Investigators of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project, *Cancer*, *74*: 3146-3158, 1994.
- 67 Loeb,S., Roehl,K.A., Nadler,R.B., Yu,X. and Catalona,W.J. Prostate specific antigen velocity in men with total prostate specific antigen less than 4 ng/ml, *J.Urol.*, *178*: 2348-2352, 2007.
- 68 Lövgren,J., Rajakoski,K., Karp,M., Lundwall,A. and Lilja,H. Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, *238*: 549-555, 1997.
- 69 Lundwall,A. and Lilja,H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA, *FEBS Lett.*, *214*: 317-322, 1987.
- 70 Mazokopakis,E.E., Batistakis,A.G. and Starakis,I.K. The effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentration, *Hell.J.Nucl.Med.*, *10*: 119, 2007.
- 71 Mettlin,C., Chesley,A.E., Murphy,G.P., Bartsch,G., Toi,A., Bahnson,R. and Church,P. Association of free PSA percent, total PSA, age, and gland volume in the detection of prostate cancer, *Prostate*, *39*: 153-158, 1999.
- 72 Mikolajczyk,S.D., Catalona,W.J., Evans,C.L., Linton,H.J., Millar,L.S., Marker,K.M., Katir,D., Amirkhan,A. and Rittenhouse,H.G. Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer, *Clin.Chem.*, *50*: 1017-1025, 2004.
- 73 Mikolajczyk,S.D., Grauer,L.S., Millar,L.S., Hill,T.M., Kumar,A., Rittenhouse,H.G., Wolfert,R.L. and Saedi,M.S. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum, *Urology*, *50*: 710-714, 1997.
- 74 Mikolajczyk,S.D., Marker,K.M., Millar,L.S., Kumar,A., Saedi,M.S., Payne,J.K., Evans,C.L., Gasior,C.L., Linton,H.J., Carpenter,P. and Rittenhouse,H.G. A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer, *Cancer Res.*, *61*: 6958-6963, 2001.

- 75 Mikolajczyk,S.D., Marks,L.S., Partin,A.W. and Rittenhouse,H.G. Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex, *Urology*, 59: 797-802, 2002.
- 76 Mikolajczyk,S.D., Millar,L.S., Marker,K.M., Wang,T.J., Rittenhouse,H.G., Marks,L.S. and Slawin,K.M. Seminal plasma contains "BPSA," a molecular form of prostate-specific antigen that is associated with benign prostatic hyperplasia, *Prostate*, 45: 271-276, 2000.
- 77 Mikolajczyk,S.D., Millar,L.S., Wang,T.J., Rittenhouse,H.G., Marks,L.S., Song,W., Wheeler,T.M. and Slawin,K.M. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue, *Cancer Res.*, 60: 756-759, 2000.
- 78 Mikolajczyk,S.D., Millar,L.S., Wang,T.J., Rittenhouse,H.G., Wolfert,R.L., Marks,L.S., Song,W., Wheeler,T.M. and Slawin,K.M. "BPSA," a specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia, *Urology*, 55: 41-45, 2000.
- 79 Mikolajczyk,S.D. and Rittenhouse,H.G. Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer, *Keio J.Med.*, 52: 86-91, 2003.
- 80 Morote,J., Encabo,G., Lopez,M.A. and De Torres,I.M. The free-to-total serum prostatic specific antigen ratio as a predictor of the pathological features of prostate cancer, *BJU.Int.*, 83: 1003-1006, 1999.
- 81 Nadler,R.B., Humphrey,P.A., Smith,D.S., Catalona,W.J. and Ratliff,T.L. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels, *J.Urol*, 154: 407-413, 1995.
- 82 Nurmikko,P., Pettersson,K., Piironen,T., Hugosson,J. and Lilja,H. Discrimination of prostate cancer from benign disease by plasma measurement of intact, free prostate-specific antigen lacking an internal cleavage site at Lys145-Lys146, *Clin.Chem.*, 47: 1415-1423, 2001.
- 83 Oesterling,J.E., Jacobsen,S.J. and Chute,C.G. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges, *JAMA*, 270: 860-866, 1993.
- 84 Oesterling,J.E., Rice,D.C., Glenski,W.J. and Bergstralh,E.J. Effect of cystoscopy, prostate biopsy, and transurethral resection of prostate on serum prostate-specific antigen concentration, *Urology*, 42: 276-282, 1993.
- 85 Oesterling,J.E., Roy,J., Agha,A., Shown,T., Krarup,T., Johansen,T., Lagerkvist,M., Gormley,G., Bach,M. and Waldstreicher,J. Biologic variability of prostate-specific antigen and its usefulness as a marker for prostate cancer: effects of finasteride. Finasteride PSA Study Group, *Urology*, 51: 58-63, 1998.
- 86 Ornstein,D.K., Smith,D.S., Humphrey,P.A. and Catalona,W.J. The effect of prostate volume, age, total prostate specific antigen level and acute inflammation on the percentage of free serum prostate specific antigen levels in men without clinically detectable prostate cancer, *J.Urol.*, 159: 1234-1237, 1998.

- 87 Pannek,J. and Brands,F.H. [Additional aids in detection of prostate carcinomas? PSA-prostatic volume quotient, PSA-doubling time, age-dependent PSA reference values and PSA in urine], *Urologe A*, 39: 324-329, 2000.
- 88 Pannek,J., Marks,L.S., Pearson,J.D., Rittenhouse,H.G., Chan,D.W., Shery,E.D., Gormley,G.J., Subong,E.N., Kelley,C.A., Stoner,E. and Partin,A.W. Influence of finasteride on free and total serum prostate specific antigen levels in men with benign prostatic hyperplasia, *J.Urol.*, 159: 449-453, 1998.
- 89 Pannek,J., Rittenhouse,H.G., Chan,D.W., Epstein,J.I., Walsh,P.C. and Partin,A.W. The use of percent free prostate specific antigen for staging clinically localized prostate cancer, *J.Urol.*, 159: 1238-1242, 1998.
- 90 Pannek,J., Rittenhouse,H.G., Evans,C.L., Finlay,J.A., Bruzek,D.J., Cox,J.L., Chan,D.W., Subong,E.N. and Partin,A.W. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 (hK2) in urine are not clinically useful for early detection and staging of prostate cancer, *Urology*, 50: 715-721, 1997.
- 91 Papsidero,L.D., Wang,M.C., Valenzuela,L.A., Murphy,G.P. and Chu,T.M. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients, *Cancer Res.*, 40: 2428-2432, 1980.
- 92 Partin,A.W., Brawer,M.K., Bartsch,G., Horninger,W., Taneja,S.S., Lepor,H., Babaian,R., Childs,S.J., Stamey,T., Fritsche,H.A., Sokoll,L., Chan,D.W., Thiel,R.P. and Cheli,C.D. Complexed prostate specific antigen improves specificity for prostate cancer detection: results of a prospective multicenter clinical trial, *J.Urol.*, 170: 1787-1791, 2003.
- 93 Partin,A.W., Brawer,M.K., Subong,E.N.P., Kelley C.A., Cox,J.L., Bruzek,D.J., Pannek,J., Meyer,G.E. and Chan,D.W. Prospective evaluation of percent free-PSA and complexed-PSA for early detection of prostate cancer, *Prostate Cancer Prostatic Diseases*, 1: 197-203, 1998.
- 94 Partin,A.W., Carter,H.B., Chan,D.W., Epstein,J.I., Oesterling,J.E., Rock,R.C., Weber,J.P. and Walsh,P.C. Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia, *J.Urol*, 143: 747-752, 1990.
- 95 Partin,A.W., Catalona,W.J., Southwick,P.C., Subong,E.N., Gasior,G.H. and Chan,D.W. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age, *Urology*, 48: 55-61, 1996.
- 96 Partin,A.W., Criley,S.R., Subong,E.N., Zincke,H., Walsh,P.C. and Oesterling,J.E. Standard versus age-specific prostate specific antigen reference ranges among men with clinically localized prostate cancer: A pathological analysis, *J.Urol*, 155: 1336-1339, 1996.
- 97 Partin,A.W., Kattan,M.W., Subong,E.N., Walsh,P.C., Wojno,K.J., Oesterling,J.E., Scardino,P.T. and Pearson,J.D. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update, *JAMA*, 277: 1445-1451, 1997.
- 98 Partin,A.W. and Oesterling,J.E. The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994, *J.Urol.*, 152: 1358-1368, 1994.

- 99 Parwani,A.V., Marlow,C., Demarzo,A.M., Mikolajczyk,S.D., Rittenhouse,H.G., Veltri,R.W. and Chan,T.Y. Immunohistochemical staining of precursor forms of prostate-specific antigen (proPSA) in metastatic prostate cancer, *Am.J.Surg.Pathol.*, *30*: 1231-1236, 2006.
- 100 Peter,J., Unverzagt,C., Krogh,T.N., Vorm,O. and Hoesel,W. Identification of precursor forms of free prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry, *Cancer Res.*, *61*: 957-962, 2001.
- 101 Pettersson,K., Piironen,T., Seppala,M., Liukkonen,L., Christensson,A., Matikainen,M.T., Suonpaa,M., Lövgren,T. and Lilja,H. Free and complexed prostate-specific antigen (PSA): in vitro stability, epitope map, and development of immunofluorometric assays for specific and sensitive detection of free PSA and PSA-alpha 1-antichymotrypsin complex, *Clin.Chem.*, *41*: 1480-1488, 1995.
- 102 Peyromaure,M., Fulla,Y., Debre,B. and Dinh-Xuan,A.T. Pro PSA : a "pro cancer" form of PSA?, *Med.Hypotheses*, *64*: 92-95, 2005.
- 103 Polascik,T.J., Oesterling,J.E. and Partin,A.W. Prostate specific antigen: a decade of discovery-what we have learned and where we are going, *J.Urol.*, *162*: 293-306, 1999.
- 104 Reissigl,A., Pointner,J., Horninger,W., Ennemoser,O., Strasser,H., Klocker,H. and Bartsch,G. Comparison of different prostate-specific antigen cutpoints for early detection of prostate cancer: results of a large screening study, *Urology*, *46*: 662-665, 1995.
- 105 Riegman,P.H., Vlietstra,R.J., van der Korput,J.A., Romijn,J.C. and Trapman,J. Characterization of the prostate-specific antigen gene: a novel human kallikrein-like gene, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *159*: 95-102, 1989.
- 106 Rittenhouse,H.G. and Chan,D.W. Can complexed PSA be used as a single test for detecting prostate cancer?, *Urology*, *54*: 4-5, 1999.
- 107 Robert Koch Institut Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends, 5., überarbeitete, akt.Ausgabe, Saarbrücken, 68, 2006.
- 108 Roddam,A.W., Duffy,M.J., Hamdy,F.C., Ward,A.M., Patnick,J., Price,C.P., Rimmer,J., Sturgeon,C., White,P. and Allen,N.E. Use of Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoforms for the Detection of Prostate Cancer in Men with a PSA Level of 2-10 ng/ml: Systematic Review and Meta-Analysis, *Eur.Urol. Sep*; *48*(3); discussion 398-9. 2005.
- 109 Roehl,K.A., Antenor,J.A. and Catalona,W.J. Robustness of free prostate specific antigen measurements to reduce unnecessary biopsies in the 2.6 to 4.0 ng./ml. range, *J.Urol.*, *168*: 922-925, 2002.
- 110 Roehrborn,C.G., Oesterling,J.E., Olson,P.J. and Padley,R.J. Serial prostate-specific antigen measurements in men with clinically benign prostatic hyperplasia during a 12-month placebo-controlled study with terazosin. HYCAT Investigator Group. Hytrin Community Assessment Trial, *Urology*, *50*: 556-561, 1997.

- 111 Scattoni,V., Raber,M., Montorsi,F., Da Pozzo,L., Brausi,M., Calori,G., Freschi,M. and Rigatti,P. Percent of free serum prostate-specific antigen and histological findings in patients undergoing open prostatectomy for benign prostatic hyperplasia, *Eur.Urol.*, *36*: 621-630, 1999.
- 112 Schmid,H.P., Semjonow,A. and Maibach,R. Prostate-specific antigen doubling time: a potential surrogate end point in hormone-refractory prostate cancer, *J.Clin Oncol.*, *17*: 1645-1646, 1999.
- 113 Schroder,F.H., Carter,H.B., Wolters,T., van den Bergh,R.C., Gosselaar,C., Bangma,C.H. and Roobol,M.J. Early Detection of Prostate Cancer in 2007 Part 1: PSA and PSA Kinetics, *Eur.Urol.*, 2007.
- 114 Schroder,F.H., Roobol,M.J., van der Kwast,T.H., Kranse,R. and Bangma,C.H. Does PSA velocity predict prostate cancer in pre-screened populations?,*Eur.Urol.*, *49*: 460-465,2006.
- 115 Schröder,F.H., van der Crujisen-Koeter,I., De Koning,H.J., Vis,A.N., Hoedemaker,R.F. and Kranse,R. Prostate cancer detection at low prostate specific antigen, *J.Urol.*, *163*: 806-812, 2000.
- 116 Seaman,E., Whang,M., Olsson,C.A., Katz,A., Cooner,W.H. and Benson,M.C. PSA density (PSAD). Role in patient evaluation and management, *Urol Clin North Am.*, *20*: 653-663, 1993.
- 117 Semjonow,A., Hamm,M. and Rathert,P. Elimination kinetics of prostate-specific antigen serum and urine, *Int.J.Biol.Markers*, *9*: 15-20, 1994.
- 118 Semjonow,A., Hamm,M. and Rathert,P. [The quotient of prostate-specific antigen and prostate volume. Improved differentiation between benign prostatic hyperplasia and locally circumscribed prostate cancer], *Urologe A*, *32*: 250-253, 1993.
- 119 Sensabaugh,G.F. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification, *J Forensic Sci.*, *23*: 106-115, 1978.
- 120 Sinha,A.A., Hagen,K.A., Sibley,R.K., Wilson,M.J., Limas,C., Reddy,P.K., Blackard,C.E. and Gleason,D.F. Analysis of fixation effects on immunohistochemical localization of prostatic specific antigen in human prostate, *J.Urol.*, *136*: 722-727, 1986.
- 121 Smith,D.S. and Catalona,W.J. Rate of change in serum prostate specific antigen levels as a method for prostate cancer detection, *J.Urol.*, *152*: 1163-1167, 1994.
- 122 Soletormos,G., Semjonow,A., Sibley,P.E., Lamerz,R., Petersen,P.H., Albrecht,W., Bialk,P., Gion,M., Junker,F., Schmid,H.P. and Van Poppel,H. Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences for clinical practice, *Clin.Chem.*, *51*: 1342-1351, 2005.
- 123 Southwick,P.C., Catalona,W.J., Partin,A.W., Slawin,K.M., Brawer,M.K., Flanigan,R.C., Patel,A., Richie,J.P., Walsh,P.C., Scardino,P.T., Lange,P.H., Gasior,G.H., Parson,R.E. and Loveland,K.G. Prediction of post-radical prostatectomy pathological outcome for stage T1c prostate cancer with free prostate specific antigen: a prospective multicenter clinical trial, *J.Urol.*, *162*: 1346-1351, 1999.

- 124 Stamey, T.A., Kabalin, J.N., McNeal, J.E., Johnstone, I.M., Freiha, F., Redwine, E.A. and Yang, N. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients, *J.Urol*, *141*: 1076-1083, 1989.
- 125 Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S. and Redwine, E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate, *N.Engl.J Med*, *317*: 909-916, 1987.
- 126 Stamey, T.A. and Yemoto, C.E. Examination of the 3 molecular forms of serum prostate specific antigen for distinguishing negative from positive biopsy: relationship to transition zone volume, *J.Urol.*, *163*: 119-126, 2000.
- 127 Stenman, U.H. Prostate-specific antigen, clinical use and staging: an overview, *Br.J.Urol.*, *79 Suppl 1*: 53-60, 1997.
- 128 Stenman, U.H., Hakama, M., Knekt, P., Aromaa, A., Teppo, L. and Leinonen, J. Serum concentrations of prostate specific antigen and its complex with alpha 1-antichymotrypsin before diagnosis of prostate cancer, *Lancet*, *344*: 1594-1598, 1994.
- 129 Stenman, U.H., Leinonen, J., Alfthan, H., Rannikko, S., Tuhkanen, K. and Alfthan, O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer, *Cancer Res.*, *51*: 222-226, 1991.
- 130 Stephan, C., Cammann, H., Semjonow, A., Diamandis, E.P., Wymenga, L.F.A., Lein, M., Sinha, P., Loening, S.A. and Jung, K. Multicenter evaluation of an artificial neural network to increase prostate cancer detection rate and reduce unnecessary biopsies, *Clin.Chem.*, *48*: 1279-1287, 2002.
- 131 Stephan, C., Jung, K., Diamandis, E.P., Rittenhouse, H.G., Lein, M. and Loening, S.A. Prostate specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein markers for detection of prostate cancer, *Urology*, *59*: 2-8, 2002.
- 132 Stephan, C., Jung, K., Lein, M. and Diamandis, E.P. PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection, *Eur.J.Cancer*, *43*: 1918-1926, 2007.
- 133 Stephan, C., Jung, K., Lein, M., Sinha, P., Schnorr, D. and Loening, S.A. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer, *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, *9*: 1133-1147, 2000.
- 134 Stephan, C., Lein, M., Jung, K., Schnorr, D. and Loening, S.A. Can prostate specific antigen derivatives reduce the frequency of unnecessary prostate biopsies?[Letter], *J.Urol.*, *157*: 1371, 1997.
- 135 Stephan, C., Lein, M., Jung, K., Schnorr, D. and Loening, S.A. The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia, *Cancer*, *79*: 104-109, 1997.
- 136 Stephan, C., Meyer, H., Kwiatkowski, M., Recker, F., Cammann, H., Loening, S.A., Jung, K. and Lein, M. A (-5, -7) Pro PSA based artificial neuronal network to detect prostate cancer, *Eur.Urol.*, Nov; *50*(5): 1014-20, 2006.

- 137 Stephan,C., Schnorr,D., Loening,S.A. and Jung,K. Re: Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, et al. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2005;48:386-99, *Eur.Urol*, 48: 1059-1060, 2005.
- 138 Stephan,C., Stroebel,G., Heinau,M., Lenz,A., Roemer,A., Lein,M., Schnorr,D., Loening,S.A. and Jung,K. The ratio of prostate-specific antigen (PSA) to prostate volume (PSA density) as a parameter to improve the detection of prostate carcinoma in PSA values in the range of < 4 ng/mL, *Cancer*, 104: 993-1003, 2005.
- 139 Tabares,G., Jung,K., Reiche,J., Stephan,C., Lein,M., Peracaula,R., de,L.R. and Hoesel,W. Free PSA forms in prostatic tissue and sera of prostate cancer patients: analysis by 2-DE and western blotting of immunopurified samples, *Clin Biochem.*, 40: 343-350, 2007.
- 140 Takayama,T.K., Carter,C.A. and Deng,T. Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR, *Biochemistry*, 40: 1679-1687, 2001.
- 141 Tchetgen,M.B., Song,J.T., Strawderman,M., Jacobsen,S.J. and Oesterling,J.E. Ejaculation increases the serum prostate-specific antigen concentration, *Urology*, 47: 511-516, 1996.
- 142 Tewari,P.C. and Bluestein,B.I. Multiple forms of prostate specific antigen and the influences of immunoassay design on their measurement in patient serum, *J.Clin.Ligand Assay*, 18: 186-196, 1996.
- 143 Thompson,I.M., Ankerst,D.P., Chi,C., Goodman,P.J., Tangen,C.M., Lucia,M.S., Feng,Z., Parnes,H.L. and Coltman,C.A., Jr. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial, *J Natl.Cancer Inst.*, 98: 529-534, 2006.
- 144 Thompson,I.M., Pauler,D.K., Goodman,P.J., Tangen,C.M., Lucia,M.S., Parnes,H.L., Minasian,L.M., Ford,L.G., Lippman,S.M., Crawford,E.D., Crowley,J.J. and Coltman,C.A., Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter, *N.Engl.J.Med.*, 350: 2239-2246, 2004.
- 145 Thon,W.F., Gadban,F., Truss,M.C., Kuczyk,M., Hartmann,U. and Jonas,U. Prostate-specific antigen density--a reliable parameter for the detection of prostate cancer?, *World J.Urol*, 14: 53-58, 1996.
- 146 Tremblay,J., Frenette,G., Tremblay,R.R., Dupont,A., Thabet,M. and Dube,J.Y. Excretion of three major prostatic secretory proteins in the urine of normal men and patients with benign prostatic hypertrophy or prostate cancer, *Prostate*, 10: 235-243, 1987.
- 147 Veltri,R.W., Khan,M.A., Marlow,C., Miller,M.C., Mikolajczyk,S.D., Kojima,M., Partin,A.W. and Marks,L.S. Alterations in nuclear structure and expression of proPSA predict differences between native Japanese and Japanese-American prostate cancer, *Urology*, 68: 898-904, 2006.
- 148 Wang,M.C., Valenzuela,L.A., Murphy,G.P. and Chu,T.M. Purification of a human prostate specific antigen, *Invest Urol.*, 17: 159-163, 1979.

- 149 Watt,K.W., Lee,P.J., M'Timkulu,T., Chan,W.P. and Loo,R. Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 83: 3166-3170, 1986.
- 150 Wolff,J.M., Boeckmann,W., Effert,P.J., Handt,S. and Jakse,G. Evaluation of patients with diseases of the prostate using prostate-specific antigen density, *Br.J.Urol*, 76: 41-46, 1995.
- 151 Woodrum,D.L., Brawer,M.K., Partin,A.W., Catalona,W.J. and Southwick,P.C. Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer, *J.Urol.*, 159: 5-12, 1998.
- 152 Wu,J.T., Zhang,P., Liu,G.H. and Wilson,L. Development of an immunoassay specific for the PSA-ACT complex without the problem of high background, *J.Clin.Lab Anal.*, 12: 14-19, 1998.
- 153 Young,C.Y., Montgomery,B.T., Andrews,P.E., Qui,S.D., Bilhartz,D.L. and Tindall,D.J. Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP, *Cancer Res.*, 51: 3748-3752, 1991.
- 154 Yousef,G.M. and Diamandis,E.P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease, *Endocr.Rev.*, 22: 184-204, 2001.
- 155 Yu H., Measurement of serum prostate specific antigen levels in women and in prostatectomized men with an ultrasensitive immunoassay technique, *J.Urol*, 153: 1004-1008, 1995.
- 156 Yu H., Prostate-specific antigen in milk of lactating woman, *Clin Chem.*, 41:54-58, 1995.
- 157 Yu,H., Diamandis,E.P. and Sutherland,D.J. Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age, *Clin.Biochem.*, 27: 75-79, 1994.
- 158 Zhang,W.M., Finne,P., Leinonen,J., Vesalainen,S., Nordling,S., Rannikko,S. and Stenman,U.H. Characterization and immunological determination of the complex between prostate-specific antigen and alpha2-macroglobulin, *Clin.Chem.*, 44: 2471-2479, 1998.
- 159 Zhang,W.M., Finne,P., Leinonen,J., Vesalainen,S., Nordling,S. and Stenman,U.H. Measurement of the complex between prostate-specific antigen and alpha1-protease inhibitor in serum, *Clin.Chem.*, 45: 814-821, 1999.
- 160 Zlotta,A.R., Djavan,B., Marberger,M. and Schulman,C.C. Prostate specific antigen density of the transition zone: a new effective parameter for prostate cancer prediction, *J.Urol*, 157: 1315-1321, 1997.

8 Publikationsverzeichnis

Stephan C, Meyer HA, Paul EM, Kristiansen G, Loening SA, Lein M, Jung K.
Serum (-5.-7) pro PSA for Distinguishing Stage and Grade of Prostate Anticancer
Res. ; 27: 1833-1836, 2007.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Jung, Leiter der experimentellen Forschungsabteilung der Klinik für Urologie, Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die Überlassung des Themas und das Vertrauen, das er damit in mich gesetzt hat.

Ausdrücklich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Carsten Stephan für die sehr engagierte und aufmerksame Betreuung der Arbeit. Er stand mir während der gesamten Periode der Fertigstellung dieser Dissertation als Ratgeber zur Seite. Für die freundliche Unterstützung während der statistischen Berechnungen der Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Dr. Cammann aus dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Als nächstes bedanke ich mich bei Frau Chem. Ing. Silke Klotzek als Ansprechpartnerin im Verlauf der Erstellung der Arbeit.

Meinen Eltern und meinem Sohn danke ich herzlich für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Berlin, 05. November 2008

Eva-Maria Paul

Erklärung

„Ich, Eva-Maria Paul, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Serum(-5,-7)proPSA zur Differenzierung von Stadium und Grading eines Prostatakarzinomes“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 05. November 2008

Eva-Maria Paul

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

