

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

DISSERTATION

**Die -2proPSA-Bestimmung in der
Prostatakarzinomdiagnostik und PSA-
Methodenvergleich nach Kalibrierung
mit unterschiedlichen
Referenzmaterialien**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

von
Anna-Maria Kahrs
aus Bremen

Gutachter: 1. _____ PD Dr. med. C. Stephan _____
2. _____ PD Dr. med. A. Semjonow _____
3. _____ Prof. Dr. H. Klocker _____

Datum der Promotion: _____ 19.03.2010 _____

1. Einleitung	5
1.1 Das Prostatakarzinom.....	5
1.2 Prostataspezifisches Antigen (PSA).....	7
1.2.1 Geschichte, Biochemie und Funktion des PSA	7
1.2.2 Molekulare Formen des PSA.....	9
1.2.3 Subformen des freien PSA.....	10
1.2.4 Einflussfaktoren des PSA.....	12
1.2.5 Verbesserungen der PSA-Diagnostik.....	13
1.3 Stand der Forschung.....	15
1.3.1 Nachweis molekularer Formen des PSA.....	15
1.3.2 Einsatz multivariater Auswertemodelle.....	17
2. Aufgabenstellung	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Untersuchte Probanden	20
3.1.1 Probenmaterial	21
3.2 Messungen	22
3.2.1 tPSA- und fPSA-Bestimmungen.....	22
3.2.2 Messung des [-2]proPSA.....	22
3.3 Methodenvergleich.....	24
3.4 Klinische Untersuchung	25
3.4.1 Prostatavolumenbestimmung	25
3.4.2 Digitale rektale Untersuchung.....	25
3.4.3 Histologie.....	25
3.5 ANN	27
3.6 Statistische Auswertung.....	28
4. Ergebnisse	29
4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs	29
4.2 ProPSA	31
4.2.1 Analytische Daten zum neuen p2PSA-Assays	31
4.2.2 Analyse des proPSA.....	32
4.2.3 ROC-Analyse und ANN-Auswertung.....	34
4.3 Methodenvergleich.....	39
4.3.1 Analytische Präzision der Hybritech und WHO kalibrierten PSA und fPSA Testsysteme	39
4.3.2 Äquimolarität des tPSA WHO Tests	41
4.3.3 Proben der Studie in bestimmten PSA-Bereichen.....	42
4.3.4 Methodenvergleich	43
4.3.5 Diagnostische Genauigkeit.....	45
5. Diskussion	46
5.1 ProPSA	46
5.2 Methodenvergleich.....	52
6. Zusammenfassung	57
7. Literatur	59

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT-PSA	α_1 -Antichymotrypsin-PSA Komplex
AMG-PSA	α_2 -Makroglobulin-PSA Komplex
ANN	artifizielles neuronales Netzwerk
API-PSA	PSA gebunden an α_1 -Proteaseinhibitor
AUC	Fläche unter der ROC Kurve
BPH	benigne Prostatahyperplasie
bPSA	Subform des fPSA, vermehrt nachgewiesen in der Übergangszone der Prostata bei benigner Prostatahyperplasie
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CI	Konfidenzintervall
cPSA	gebundenes (complexed) PSA
CV	„Coefficient of Variation“: Variationskoeffizient
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	digitale rektale Untersuchung
%fPSA	prozentuales freies PSA oder fPSA/tPSA
fPSA	freies ungebundenes PSA
fPSAi	enzymatisch inaktives, intaktes fPSA
LOO	„Leave One Out“ Methode der Kreuzvalidierung
LR	logistische Regression
Lys	Lysin
NEM	„No Evidence of Malignancy“: kein Hinweis auf Malignität
o.g.	oben genannt
P2PSA	[-2]pro PSA
p-Wert	Signifikanzwert
PCa	Prostatakarzinom
proPSA	aus 244 Aminosäuren bestehende Vorstufe des enzymatisch aktiven PSA
PSA	prostataspezifisches Antigen
PSAD	PSA-Density oder auch PSA-Dichte
PSAV	PSA-Velocity oder auch PSA-Anstiegsgeschwindigkeit
ROC-Kurve	Receiver-operating Characteristic-Kurve
SD	„Standard Deviation“: Standardabweichung
tPSA	totales Prostata-Spezifisches Antigen
TRUS	transrektaler Ultraschall
v.a.	vor allem

1. Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Jährlich werden in Deutschland etwa 58.500 bösartige Neubildungen der Prostata diagnostiziert. Damit ist das Prostatakarzinom (PCa) mit 25,4% in Deutschland wie auch in den USA die häufigste Krebserkrankung des Mannes (1).

Bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen steht das Prostatakarzinom in Deutschland mit 10% an dritter und in den USA mit 9% an zweiter Stelle (1).

Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten liegt bei 70 Jahren. Dieses ist etwa 2 Jahre später als für maligne Erkrankungen im Allgemeinen. Die Prävalenz dieser Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter erheblich an (2). Die Risikofaktoren für das PCa sind weitestgehend unbekannt. Bei jüngeren Männern wird jedoch eine genetische Disposition diskutiert, was auch das gehäufte Auftreten des PCa in bestimmten ethnischen Gruppen erklären könnte (1). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Übergewicht, Bewegungsmangel und eine fettreiche Ernährung Risikofaktoren für ein PCa sind (3).

Über die Lokalisation des PCa ist bekannt, dass das Karzinom – im Gegensatz zur benignen Prostatahyperplasie (BPH) – eher in der „peripheren Zone“ der Drüse auftritt, während die BPH sich eher in der zentralen Zone der Prostata entwickelt (4).

Die Prognose des PCa hängt stark von Tumorstadium, Ausbreitung und möglicher Metastasenbildung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ab. Die Heilungschancen bei einem lokal begrenzten Tumor ohne Lymphknotenbefall liegen bei nahezu 100%, während bei Kapselüberschreitung oder gar Metastasierung in andere Organe die 5-Jahres-Überlebensrate deutlich sinkt (1).

Die Tatsache, dass die Aggressivität des PCa gehäuft bei jüngeren Männern als hoch und im Allgemeinen die klinischen Symptome als gering einzustufen sind, verdeutlicht die Notwendigkeit einer zuverlässigen Früherkennung (1). 1971 wurde ein gesetzliches Früherkennungsprogramm für Männer ab dem 45. Lebensjahr eingeführt. Dieses „Screening“ sieht eine jährliche Kontrolle mittels Anamnese und digitaler rektaler Untersuchung (DRU) vor. Die Palpation der Prostata ist allerdings stark vom Untersucher abhängig und daher schwer zu standardisieren. Hinzu kommt,

dass sich der Tumor bei einem auffälligen Tastbefund schon in über 70% der Fälle in einem fortgeschrittenen Stadium befindet oder bereits metastasiert ist. Daher ist die DRU als alleinige Screening-Methode unzureichend (5). In den 80er Jahren wurde die Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) als weitere Früherkennungsmethode eingeführt. Mit der Etablierung des PSA als Marker stieg nicht nur die Rate der entdeckten Neuerkrankungen drastisch an, sondern es war zudem eine deutliche Verschiebung zur Entdeckung lokal begrenzter Tumoren zu verzeichnen (6). In den 90er Jahren beschrieben verschiedene Forschungsgruppen erstmals unterschiedliche molekulare Formen des PSA (7-9). In der Hoffnung, die Spezifität des PSA-Tests erhöhen zu können, waren nun diese Unterformen des PSA Gegenstand der Forschung. Es ist nämlich bekannt, dass der PSA-Wert auch bei nicht malignen Veränderungen der Prostata sowie nach Manipulationen ansteigen kann und damit nicht sehr spezifisch ist (10).

Heutzutage kann das PCa bei etwa 91% der Patienten im lokalen Stadium diagnostiziert werden (1), was neben der Verbesserung technischer Methoden (transrektaler Ultraschall und Anzahl der Biopsien) v.a. auf die verbesserte Früherkennung durch den PSA-Wert zurückzuführen ist. Das PSA und seine verschiedenen molekularen Formen sollen nun Gegenstand des nächsten Kapitels sein.

1.2 Prostataspezifisches Antigen (PSA)

1.2.1 Geschichte, Biochemie und Funktion des PSA

Vor mehr als zwei Jahrzehnten wurde das PSA in die urologische Praxis eingeführt. Bis heute wird dieser Biomarker für die Früherkennung, das Staging und die Verlaufskontrolle des PCa routinemäßig eingesetzt. Es war der erste durch die „Food and Drug Administration“ zugelassene Tumormarker zur Detektion des PCa bei Männern ab dem 50. Lebensjahr (11).

Biochemisch gesehen ist das PSA ein Glykoprotein, bestehend aus 237 Aminosäuren mit einer Kohlenhydratkette. Es hat ein molekulares Gewicht von 28.430 Da (12) und besitzt die Funktion einer Serinprotease. Das Protein wurde in den frühen 70er Jahren entdeckt und fand in dieser Zeit in den Arbeiten verschiedener unabhängiger Forschungsgruppen Erwähnung (13;14). Sensabaugh benutzte als erster die Immunelektrophorese, um die Spezifität des Antigens für Seminalplasma nachzuweisen. Aufgrund des von ihm festgestellten Molekulargewichts von 30 kDa (15) nannte er das Prostataspezifische Antigen P30. Die Benennung des Antigens als Prostataspezifisches Antigen erfolgte 1979 durch Wang et al. (16).

PSA ist ein Produkt des Kallikrein-Genlokus auf dem langen Arm des Chromosoms 19 und wird fast ausschließlich in den Epithelzellen der Prostata exprimiert (17). Aufgrund seiner Lokalisation auf Chromosom 19, seiner Funktion als Serinprotease, der Regulierung durch Androgene und seiner Ähnlichkeit in DNA- und Aminosäuresequenz wird das PSA den humanen Kallikreinen zugeordnet (17). Zusätzlich zum PSA könnten in Zukunft auch andere in der Prostata gebildete humane Kallikreine, wie z.B. das humane glanduläre Kallikrein 2 oder das humane Kallikrein 11 oder 15, in der PCa-Diagnostik an Bedeutung gewinnen (18;19).

Das PSA konnte im endoplasmatischen Retikulum, in den Sekretgranula und den luminalen Zelloberflächen der Prostata nachgewiesen werden (15). Allerdings kommt PSA in sehr geringen Mengen auch in anderen Geweben vor, beispielsweise in Paraurethraldrüsen, der Brustdrüse, der Schilddrüse sowie in Speicheldrüsen, Lungen, Hoden und Uterus (20).

Die Synthese des Antigens erfolgt zunächst als Präprotein mit 261 Aminosäuren. Nach der Prozessierung wird proPSA, ein aus 244 Aminosäuren bestehendes Protein, in das Drüsenlumen sezerniert. Durch proteolytische Abspaltung von sieben Aminosäuren entsteht das enzymatisch aktive PSA (12). In seiner Funktion als Serinprotease spaltet es Peptidbindungen an der Carboxylgruppe von Leucin und Tyrosin (21). Nach abgeschlossener Prozessierung und Sekretion besteht das Molekül dann nur noch aus den oben genannten 237 Aminosäuren (12). Das von den Epithelzellen synthetisierte PSA wird per Exozytose ins Lumen der Drüse abgegeben und gelangt nur zu einem sehr geringen Anteil in den systemischen Kreislauf. Es dient im Seminalplasma der Verflüssigung des Samens nach der Ejakulation durch Proteolyse der gebildenden Proteine Fibronectin und Semenogelin I und II (22). Die Konzentration des PSA im Sperma liegt bei 0,5-3 g/l, wohingegen die Konzentration im Serum gesunder Männer weniger als 4 µg/l beträgt (22). Damit ist die Serumkonzentration des PSA normalerweise etwa eine Million Mal geringer als in der Samenflüssigkeit. Der PSA-Grenzwert von 4 µg/l wird in der urologischen Praxis als die Referenzgrenze betrachtet, bei deren Überschreitung weitere Diagnostik notwendig ist (23).

Durch die Zerstörung der Basalmembran der Epithelzellen der Prostata kann es zum exzessiven Ausstoß von PSA ins Blut kommen. Diese Zerstörung kann auf unterschiedlichste Weise begründet sein: sowohl durch mechanische Manipulation als auch durch das ungehemmte Wachstum von Tumorgewebe, aber auch durch schlichtes Größenwachstum wie bei der BPH (19).

Im hyperplastischen und gesunden Gewebe gelangt das PSA durch schmale interzelluläre Zwischenräume über die Extrazellularflüssigkeit ins Serum (25). Im Karzinomgewebe sind sowohl Aufbau und Polarisation der Epithelzelle wie auch die Sekretionswege gestört. Es ist zwar noch nicht geklärt, wie genau der Übertritt von PSA in den Blutkreislauf vonstatten geht, jedoch konnte erwiesen werden, dass durch die zerstörte Matrix beim PCa-Patienten das PSA im Serum in wesentlich höherer Konzentration auftreten kann als beim Gesunden (24). Ist PSA einmal ins Blut übergetreten, wird ein großer Teil an endogene Proteinaseinhibitoren gebunden, ein kleinerer Teil verbleibt ungebunden bzw. frei. Auf diese molekularen Formen des PSA wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

1.2.2 Molekulare Formen des PSA

Anfang der 90er Jahre wurde entdeckt, dass PSA im Blut in verschiedenen molekularen Formen vorliegt: dem komplexierten PSA und dem freien PSA. Während das freie PSA ungebunden im Blut zirkuliert, liegt das enzymatisch aktive PSA gebunden an andere Proteine vor (8).

Komplexiertes PSA wird im Serum an Proteinaseinhibitoren, so wie zum Beispiel an α 1-Antichymotrypsin (ACT-PSA), und α 2-Makroglobulin (AMG-PSA) gebunden. Diese Proteinaseinhibitoren liegen im Blut in einer vielfach höheren Konzentration als das PSA vor. In sehr geringen Mengen (etwa 5%) kann PSA auch an α 1-Proteinaseinhibitor (API) und Protein C (PCI) gebunden werden (25). Diese Bindung an Proteinaseinhibitoren geschieht vermutlich, da PSA ansonsten als Serinprotease fungiert und möglicherweise sonst im Blut als solche aktiv wäre (10).

Als Gesamt-PSA oder totales PSA (tPSA) wird die Summe aus freiem und gebundenem PSA bezeichnet; komplexiertes PSA wird die Summe aus ACT- und API-PSA genannt (25).

Das α 1-Antichymotrypsin bindet irreversibel den größten Teil des PSA. Der ACT-PSA-Komplex hat eine Halbwertszeit von ca. 2-3 Tagen und ist mit einem Anteil von 70-90% der bedeutendste Anteil des komplexierten PSA (7;9). Bei Karzinompatienten ist der relative Anteil an ACT-PSA höher als bei BPH-Patienten (7). Initiale präanalytische Probleme bei der Erfassung des ACT-PSA mit fehlerhaft erhöhten Werten, hervorgerufen durch die Bindung der Testantikörper an ACT-Cathepsin-G-Komplexe, konnten mittlerweile gelöst werden (26). Trotz einer erfolgreichen Überarbeitung der Testsysteme konnte sich dieser Marker nie in der Routine durchsetzen; seine Fähigkeit, zwischen PCa und BPH zu unterscheiden wird noch immer kontrovers diskutiert (27;28). Ein Testsystem der Fa. Roche wurde vom Markt genommen, ein weiteres Testsystem ist nicht kommerziell erhältlich (29).

Das α 2-Makroglobulin bindet weitaus schneller und aggressiver an das PSA-Molekül und bildet so den zweiten wichtigen Komplex: AMG-PSA (30;31). AMG-PSA konnte lange nicht immunologisch nachgewiesen werden, da das AMG wegen seiner Größe die PSA-Epitope komplett umhüllt und somit verdeckt (25). Durch eine neues Testverfahren ist dies nun möglich geworden: Die Nutzung von PSA-

Immunoabsorption gefolgt von einer Manipulation am pH-Wert ermöglicht die Lösung des PSA-Moleküls von dem 25-fach größeren α 2-Makroglobulin und damit seine Messung (32).

Des Weiteren wird dieser Komplex sehr zügig hepatisch eliminiert, was eine Bestimmung der Serumkonzentration erschwerte. Im Gegensatz zum freien und an α 1-Antichymotrypsin gebundenen PSA gibt es einige Hinweise, dass die Bindung durch α 2-Makroglobulin die enzymatische Aktivität des PSA nicht komplett verhindert (33).

In sehr geringen Mengen kann das PSA auch Bindungen mit dem α 1-Proteinaseinhibitor eingehen und wird dann API-PSA genannt (34). Der Medianwert des Anteils von API-PSA am tPSA ist bei BPH-Patienten signifikant höher als bei PCa-Patienten (0,9% bei PCa, 1,6% bei BPH) (35). Ein routinemäßiger Einsatz des API-PSA ist trotz aktueller Weiterentwicklung ist aufgrund des sehr geringen Anteils am tPSA eher unwahrscheinlich.

Etwa 10-30% der PSA-Moleküle liegen in freier, ungebundener Form vor. Das heißt, sie bilden keine Komplexe mit Proteinaseinhibitoren und sind enzymatisch inaktiv. Freies PSA wird glomerulär filtriert und hat im Gegensatz zum ACT-PSA nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden (36). Das freie PSA und seine Subformen werden im folgenden Abschnitt detailliert besprochen.

1.2.3 Subformen des freien PSA

Das freie PSA (fPSA) liegt sowohl im Prostatagewebe als auch im Serum in verschiedenen Subformen vor. Man unterscheidet das intakte fPSA (fPSAi), welches eine durchgehende Aminosäurekette aufweist, vom so genannten „nicked“ fPSA, das aus einer in sich gespaltenen Aminosäurekette besteht.

Das so genannte benigne PSA (bPSA) besteht, wie das reife PSA, aus 237 Aminosäuren, allerdings mit einem Bruch der Kette bei Lys 182 und Lys 145. Das bPSA wurde erstmalig im Jahr 2000 von Mikolajczyk et al. (37) beschrieben. Diese Subform des fPSA befindet sich überwiegend in der Übergangszone der Prostata. Im Gewebe der BPH hat das bPSA einen Anteil von bis zu 11,4% am tPSA, während es in normalen oder neoplastischen Gewebe lediglich etwa 4,9% beträgt. Das bPSA konnte im Serum als Marker für die BPH nachgewiesen werden, nicht jedoch als Marker für das PCa (38). Bisher ist keine biologische Funktion des bPSA bekannt, es

scheint lediglich ein Produkt eines posttranslationalen proteolytischen Kettenbruchs im Prostatagewebe zu sein (39).

Als fPSAi wird eine intakte, aber enzymatisch inaktive Subform des fPSA bezeichnet. Eine Untersuchung der Arbeitsgruppe um Steuber et al. (40) ergab keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von fPSAi bei PCa- und BPH-Patienten. Allerdings war der Quotient aus fPSAi und fPSA bei den Tumorpatienten im Gegensatz zu den Patienten mit BPH signifikant erhöht (40;41).

Das proPSA ist eine Unterform des fPSA und besteht wie bereits erwähnt aus 244 Aminosäuren mit einer in sich intakten Aminosäurekette. Es wird nach Sekretion ins Drüsenlumen durch Abspaltung von 7 Aminosäuren am N-terminalen Ende zum enzymatisch aktiven PSA. Die Spaltung findet zumeist zwischen Arginin und Isoleucin statt (42). Es existieren mehrere Formen des proPSA, die native und die abgeschnittene Variante, bei der sich eine bis fünf Aminosäuren in der Pro-Peptid-Sequenz befinden, statt der sonst vorhandenen sieben. Alle Formen können sowohl im Prostatagewebe als auch im Serum vorliegen. Das [-7]proPSA ist die eben erwähnte Form, mit 244 AS. Des Weiteren gibt es das [-5]proPSA (2 AS abgespalten), das [-4]proPSA (3 AS abgespalten), das [-2]proPSA (5 AS abgespalten) und das [-1]proPSA (6 AS abgespalten) (43;44).

Für die Früherkennung des PCa sind insbesondere [-2]proPSA (p2PSA) und [-4]proPSA von Bedeutung, da sie sich bei PCa-Patienten offenbar vermehrt anreichern. Ein Grund für die Anreicherung gerade dieser Moleküle könnte sein, dass sie durch den Bruch in ihrer Aminosäurekette seltener aktiviert werden (45): im Gegensatz zu [-5]proPSA und [-7]proPSA werden [-2]proPSA und [-4]proPSA nicht vom humanen Kallikrein 2 aktiviert (39).

Im Jahre 2003 konnte die Forschungsgruppe um Catalona et al. an 1091 Patienten bei 90%-iger Sensitivität den diagnostischen Vorteil des Quotienten aus proPSA und fPSA ($\text{proPSA/fPSA} = \% \text{proPSA}$; Spezifität: 21%) gegenüber dem %fPSA (13%) nachweisen (46). Diese Studie schloss Patienten mit einem PSA zwischen 2 und 10 $\mu\text{g/l}$ ein, wobei der größte diagnostische Vorteil im niedrigen PSA-Bereich (2-4 $\mu\text{g/l}$) lag. Abbildung 1 zeigt den Anteil der verschiedenen proPSA-Formen am fPSA.

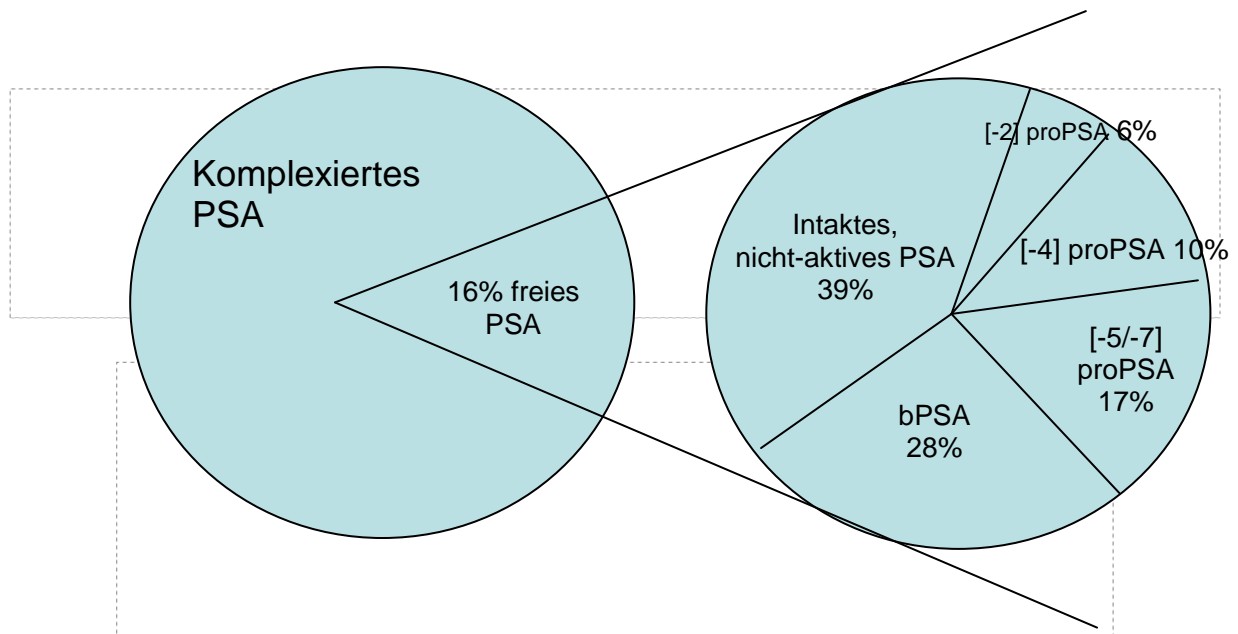


Abb. 1 Anteile des freien PSA im Serum von PCa-Patienten mit einem PSA von 4-10 µg/l. In einer Probe von 157 Männern mit nachgewiesenem PCa und PSA-Werten von 4-10 µg/l repräsentierte das %fPSA 16% des totalen PSA. BPSA repräsentierte 28% des fPSA, während proPSA 33% des fPSA darstellte. Der restliche Anteil des fPSA wird als inPSA (inaktives, intaktes PSA) beschrieben, da diese Form des fPSA nicht proPSA ist und aus weitestgehend intaktem, aber inaktivem PSA zu bestehen scheint, das keinen Komplex mit Serumproteinen bildet. Das inPSA wird berechnet, indem bPSA und proPSA vom fPSA subtrahiert werden. Gezeigt werden die Proportionen der drei Formen des proPSA (39).

1.2.4 Einflussfaktoren des PSA

Seit Mitte der 80er Jahre zählt die Messung des PSA zu den besten Vorsorgeuntersuchungen der heutigen Medizin (10;47). Zudem ist in Deutschland ein steiler Anstieg der Neuerkrankungsrate zu verzeichnen, der nicht zuletzt auf die verbesserten Früherkennungsmethoden zurückzuführen ist. Der PSA-Wert ist jedoch nicht karzinomspezifisch: Die alleinige Nutzung des PSA in der PCa-Diagnostik verfügt nur über einen geringen positiv prädiktiven Wert und eine eingeschränkte Spezifität (10;48). So zeigen aktuelle Studien zum Screeningverfahren durch PSA sogar unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Risikos an PCa zu versterben (49;50). Neben erhöhten PSA-Werten bedürfen aber auch auffällige Tastbefunde einer weiteren Abklärung. Zum histologischen Nachweis des PCa ist die Prostatabiopsie notwendig. Aufgrund der hohen Zahl falsch-positiver PSA-Werte wird in 60-80% der Fälle histologisch kein PCa nachgewiesen. Die Biopsie ist ein invasives Verfahren, das neben dem Risiko von Infektionen und Blutungen sowie

Verletzungen der umgebenen Strukturen auch eine große psychische Belastung für den Patienten darstellt und zudem hohe Kosten verursacht (47).

Es gibt neben der BPH eine Reihe von weiteren Einflussfaktoren, die zu falsch hohen Werten führen können, wie die subklinische und akute Prostatitis (51), Harnverhalt (52), stattgehabte Ejakulation oder manuelle Manipulation an der Prostata können den PSA-Wert fälschlicherweise erhöhen (53).

Die medikamentöse Behandlung von Prostatabeschwerden kann die tPSA-Werte im Serum senken und somit falsch-negative Befunde verursachen (10;54). So kann die Behandlung mit dem 5 α -Reduktase-Hemmer Finasterid einen Abfall des tPSA um ungefähr 50% bewirken (55). Da das fPSA im gleichen Maße abfällt, hat die Behandlung mit Finasterid kaum eine Auswirkung auf den Quotienten f/tPSA (%fPSA) (56). Durch eine Prostatitis aber wird das fPSA offenbar stärker als das tPSA beeinflusst, so dass das %fPSA nicht als Unterscheidungsparameter zwischen Prostatitis und Karzinom herangezogen werden sollte (57). Auch intraindividuell schwanken die Serumwerte des PSA um ca. 20% (58).

Die Nutzung von verschiedenen PSA-Testsystemen zeigt neben Unterschieden zwischen den tPSA-Werten v.a. sehr große Differenzen beim %fPSA (59). Im PSA-Bereich zwischen 4 und 10 $\mu\text{g/l}$, der so genannten „Grauzone“, hat sich die Unterscheidung zwischen BPH und PCa als besonders schwierig erwiesen. In verschiedenen Studien wurde zudem gezeigt, dass durch die strikte Anwendung des konventionellen Grenzwerts von 4,0 $\mu\text{g/l}$ eine bedeutende Anzahl von lokal begrenzten, jedoch zum Teil aggressiven PCa übersehen wird (50;60;61). Andererseits würde die alleinige Absenkung des Grenzwertes das Problem ebenfalls nicht lösen, da dadurch bis zu drei Viertel der Patienten mit einem PSA < 4 $\mu\text{g/l}$ unnötigerweise biopsiert würden (62).

1.2.5 Verbesserungen der PSA-Diagnostik

Eine Methode zur Verbesserung der PSA-Diagnostik ist die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit oder auch PSA-Velocity (PSAV). Eine Anstiegsgeschwindigkeit von über 0,75 $\mu\text{g/l}$ pro Jahr wurde mit einem Karzinomrisiko assoziiert (63). Folgestudien ergaben widersprüchliche Ergebnisse, so dass letztendlich die Anstiegsgeschwindigkeit nur bei Männern mit einem normalen tPSA und einem niedrigen Referenzlimit von 4,0 $\mu\text{g/l}$ von klinischem Nutzen ist (64;65). Ein

großer Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass große intraindividuelle Unterschiede engmaschige Kontrollen über mindestens zwei Jahre erfordern, bevor eine diagnostische Aussagekraft erreicht werden kann (66;67). Weitere aktuelle Studien zeigten einen klaren Nutzen der PSAV für die PCa-Diagnostik (68) bzw. einen sehr starken Zusammenhang zwischen dem initialen PSA-Wert und der PSAV (69). Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse anderer Studien mit sehr großen Patientenzahlen sehr zurückhaltend bezüglich des Nutzens der PSAV im Vergleich zum PSA allein (70). Eine Absenkung des Grenzwertes der PSAV von 0,75 auf 0,4 µg/l/Jahr erscheint jedoch v.a. für jüngeren Patienten sinnvoll, um eine ausreichende Sensitivität beizubehalten (71).

Eine weitere Methode zur Optimierung der Frühdiagnostik des PCa ist die Bestimmung der PSA-Dichte oder auch PSA-Density (PSAD). Sowohl bei der BPH als auch beim PCa können die PSA-Werte erhöht sein. Der Unterschied liegt hierbei darin, dass die BPH aufgrund ihrer Zellvermehrung und somit Volumenzunahme mehr PSA ins Serum entlässt, das PCa jedoch aufgrund der zerstörten Matrix. Die PSA-Dichte ist somit beim Karzinom größer. Einige Studien konnten die Wirksamkeit dieser Methode nachweisen (72;73). Jedoch ist auch dies ein kontrovers diskutiertes Verfahren, da es sich auf das schwer zu standardisierende Mittel der Prostatamessung mittels transrektalen Ultraschalls bezieht. Limitierende Faktoren der PSA-Dichte-Bestimmung bestehen in ihrer Abhängigkeit vom Untersucher und der damit verbundenen Prostatavolumenbestimmung mittels TRUS (74). Bereits geringe Messungenauigkeiten im Millimeterbereich können zu erheblichen Fehleinschätzungen des Prostatavolumens führen. Hinzu kommt, dass nur das Epithel der Prostata zur PSA-Produktion fähig ist und damit das ermittelte Drüsenvolumen nicht zwingend mit dem Serum-tPSA korreliert, da die Relation von Epithel zu Struma intraindividuell schwankt (75).

Eine weitere Möglichkeit zur verbesserten PSA-Diagnostik wurde ebenfalls Anfang der 90er Jahre beschrieben. Hierbei handelt es sich um die altersspezifischen PSA-Grenzwerte (76). In einer prospektiven Studie an 2.119 gesunden Probanden fand sich eine direkte Korrelation zwischen dem PSA-Serumspiegel und dem Alter sowie Prostatavolumen mit einer Festlegung altersspezifischer Grenzwerte (76). An einer Gruppe von 1716 Männern im Alter zwischen 40 und 79 Jahren konnte gezeigt werden, dass die oben erwähnten altersspezifischen PSA-Werte für Patienten < 60 Jahre zu hoch sowie für Patienten > 70 Jahre zu niedrig waren (77). Partin et al.

zeigten, dass sich die Karzinomerkennungsrate in der jüngeren Patientengruppe um 18% erhöhte, während sie jedoch in der Gruppe älterer Patienten um 22% abnahm (78).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass altersspezifische PSA-Werte in der Diagnostik des PCa einen Spezifitätsgewinn bei Jüngeren und eine Abnahme der Sensitivität bei Älteren erzielen. Ihr Nutzen in der klinischen Praxis ist daher fraglich. Ihre Verwendung ist weder von der FDA genehmigt, noch wird sie von den Herstellern kommerzieller PSA-Assays empfohlen (10).

Die oben genannten Konzepte der PSAV, PSAD und der altersspezifischen Referenzgrenzen wurden initial entwickelt, um die Rate der falsch-positiven und falsch-negativen Befunde eines PCa im Vergleich zum PSA zu reduzieren. Trotz aktueller Diskussionen vor allem bezüglich der PSAV, dass diese Verfahren die Aussagekraft des PSA verbessern, haben sich die Erwartungen jedoch nur teilweise erfüllt.

1.3 Stand der Forschung

1.3.1 Nachweis molekularer Formen des PSA

Um die Spezifität des PSA-Wertes weiter zu verbessern, wurde nach der Entdeckung der molekularen Formen des PSA von Lilja et al. und Stenman et al. die Forschung auf diesem Gebiet intensiv vorangetrieben (7;9;24).

Der Quotient aus fPSA und tPSA zeigte 1998 in einer richtungsweisenden prospektiven Studie von Catalona et al. eine Spezifitätserhöhung von 20% bei einer Sensitivität von 95%. Diese Studie wurde an 773 Patienten mit unauffälligem Tastbefund und einem PSA-Wert zwischen 4 und 10 µg/l durchgeführt (79). Auch andere Untersuchungen wiesen eine Verbesserung der Spezifität und die erhoffte Reduktion der unnötigen Biopsien nach (80;81). Die unterschiedlichen Verbesserungen der Spezifitäten sind teilweise durch die verschiedenen Testsysteme und Grenzwerte erklärbar. Auch im niedrigen PSA-Bereich unter 4 µg/l ist der %fPSA-Wert von diagnostischer Wertigkeit (60). Eine Studie von Jung et al. konnte eine Verbesserung der Spezifität bei 95%-iger Sensitivität im PSA Bereich <

4 µg/l mithilfe des %fPSA von 16% auf 42% im Vergleich zum tPSA zeigen (82). Weitere Arbeiten zeigten ebenfalls den Vorteil des %fPSA im niedrigen PSA Bereich (83;84).

Seit Ende der 90er Jahre konzentrierte sich die Forschung auf die Identifikation weiterer Isoformen des freien PSA, wie dem proPSA, einer Vorform des fPSA, dem so genannten „benignen PSA“, oder auch bPSA und dem intakten fPSA (fPSAi) (37;44;85). Das bPSA wurde in erhöhter Konzentration im Prostatagewebe der Transitionalzone bei BPH-Patienten nachgewiesen und daher als „benign prostatic hyperplasia associated PSA“ – bPSA – bezeichnet. Es konnte zwar zur Diagnostik der BPH, jedoch nicht zur Unterscheidung zwischen PCa und BPH herangezogen werden (37).

Das fPSAi als weitere Isoform des fPSA ist enzymatisch inaktiv und bildet mit ACT keine Komplexe (86). Trotz initialer Möglichkeit, serologisch zwischen PCa und BPH zu unterscheiden, ist die Verbesserung mithilfe des fPSAi gegenüber dem %fPSA eher nur marginal (40). Bisher gibt es für das fPSAi kein kommerziell erhältliches Testsystem.

Somit liegt der Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten bezüglich der Subformen des fPSA bei dem proPSA.

In einer Studie von 2000 konnten Micolajczyk et al. durch Untersuchungen im Prostatagewebe feststellen, dass proPSA fast ausschließlich im Tumorgewebe und nicht im normalen Gewebe der Prostata vorhanden ist (85). Des Weiteren wurde von selbiger Arbeitsgruppe im Serum nachgewiesen, dass das [-2]proPSA bei Männern mit Prostatakrebs einen Anteil von 25%-95% des freien PSA, jedoch bei gesunden Männern lediglich 6%-19% ausmacht (45).

Die Arbeitsgruppe Khan et al. konnte im Jahr 2003 weitere Vorteile des proPSA eruieren (87). Die proPSA-Formen [-2], [-4] und [-7]proPSA waren im Bereich der Grauzone eines tPSA zwischen 4 und 10 µg/l in der Lage, signifikant zwischen Patienten mit und ohne PCa zu unterscheiden. Durch die Zuhilfenahme univariater logistischer Regression wurden tPSA, %fPSA und die Summe der drei proPSA-Formen als unabhängige Prädiktoren für das PCa identifiziert. Bei 90%-iger Sensitivität erreichten diese drei Variablen eine gemeinsame Spezifität von 44%.

Sokoll et al. zeigten 2003 vielversprechende Ergebnisse in einer Studie mit 119 Männern. In einem PSA-Bereich von 2,5 bis 4 µg/l wurde durch die Bestimmung von %pPSA (proPSA/fPSA) bei einer Sensitivität von 75% die Spezifität von 33%

(%fPSA) auf 59% gesteigert (88). In einer anderen Studie von Catalona et al. konnte nachgewiesen werden, dass unter Zuhilfenahme von %pPSA nicht nur PCa signifikant von BPH unterschieden werden kann, sondern dass außerdem aggressivere Tumoren (Gleason Score 7 oder höher) besser detektiert werden (46).

Alle proPSA-Tests waren bis vor kurzem Mikrotiterplattentests. Erst seit 2007 ist ein Testsystem der Firma Beckman Coulter für Forschungszwecke nutzbar, welches als Plattform den automatisierten Access Analyser hat. Hierzu zeigten initiale Daten von Sokoll et al. an 123 Patienten, dass der Quotient [-2]proPSA zu fPSA (%[-2]proPSA oder auch %p2PSA) die größte Fläche (area under the curve, AUC) unter der „Receiver operating characteristic“ (ROC)-Kurve mit 0,69 hatte, während das %fPSA nur eine AUC von 0,61 aufwies (89). Die Anwendung dieses vielversprechenden automatisierten Testsystems an einer deutlich größeren Patientengruppe ist der Schwerpunkt dieser Arbeit.

1.3.2 Einsatz multivariater Auswertemodelle

Neben dem Aufbau verschiedener Testsysteme für die Subformen des PSA und vor allem des fPSA zeigte der Einsatz von multivariaten Auswertesystemen wie der logistischen Regression (LR) und den künstlichen neuronalen Netzwerken (ANN) eine weitere Möglichkeit der Verbesserung der Spezifität des PSA und des %fPSA.

Das Prinzip des ANN stammt vor allem aus der klinischen Chemie, der Biochemie und Neurophysiologie (90). Der erste erfolgreiche Neurocomputer wurde 1958 entwickelt (91). Die Einführung der ANN in die PCa-Diagnostik gelang 1994 durch Snow et al. (92). Dabei wurden Daten von 1.787 Patienten berücksichtigt, wobei mithilfe des ANN 87% der Patienten korrekt klassifiziert wurden. Nach der klinischen Einführung des %fPSA demonstrierten mehrere Arbeitsgruppen einen diagnostischen Vorteil bei Einbeziehung des %fPSA in die verschiedenen LR- und ANN-Modelle (93-96).

Verschiedene Studien zeigten, dass vor allem die Berücksichtigung des Testsystems für die optimale Nutzung des ANN wichtig war (97). Um eine bessere Vereinheitlichung der verschiedenen PSA- und fPSA-Tests zu ermöglichen, wurden uniforme Referenzmaterialien entwickelt (98). Die Kalibrierung mit dem so genannten

WHO-Referenzmaterial für tPSA und fPSA soll eine bessere Harmonisierung zwischen den Tests bewirken. Diese Problematik der Anpassung eines Testsystems an den WHO-Standard ist der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit.

2. Aufgabenstellung

PSA ist der in der urologischen Praxis meistgenutzte Tumormarker. Aufgrund der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Probleme und Einschränkungen wurden in den letzten Jahren viele Aktivitäten unternommen, um diesen Marker bezüglich der Spezifität und des positiv prädiktiven Wertes zu verbessern. Im Rahmen dieser Forschung wurden zunächst das fPSA und später die Isoformen des fPSA beschrieben. Gerade das proPSA gibt an dieser Stelle Hoffnung auf eine bessere Methode zur Früherkennung des PCa. Diese Arbeit widmet sich daher der verbesserten Diagnostik des PCa. Sie hat hierbei folgende Ziele:

1. Die diagnostische Aussagekraft des [-2]proPSA bezüglich seiner Spezifität für die Detektion des PCa zu prüfen.
2. Die Bewertung der Quotienten des [-2]proPSA zum fPSA für die verbesserte Diagnostik des PCa sowie deren Einsatz innerhalb von ANN-Modellen zu testen.
3. Einen Methodenvergleich zwischen der traditionellen Hybritech-Kalibrierung und der neuen WHO-Kalibrierung mit dem Access 2000 (Beckman Coulter) für die Parameter tPSA, fPSA und %fPSA durchzuführen.

Die Zielstellung dieser vorliegenden Arbeit ist es, anhand einer großen Patientengruppe die oben genannten Fragestellungen zum [-2]proPSA und zum Methodenvergleich umfassend zu beantworten.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchte Probanden

Die Bestimmungen erfolgten an Serumproben von insgesamt 642 Probanden, bei denen die Blutentnahme im Zeitraum von August 2001 bis Juni 2007 erfolgte. Alle Messungen wurden im Juli und August 2007 durchgeführt. Alle Probanden wurden in der Klinik und Poliklinik für Urologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité, Campus Mitte rekrutiert. Gründe für die Patientenüberweisung waren erhöhte PSA-Werte, auffällige DRU, Symptome einer BPH oder bereits durch Biopsie gesicherte PCa sowie die urologische Vorsorgeuntersuchung.

Von den insgesamt 642 Probanden hatten 337 Patienten ein histologisch gesichertes PCa. Die verbleibenden 301 Probanden hatten entweder eine histologisch gesicherte BPH oder chronische Prostatitis bzw. normales Prostatagewebe in der feingeweblichen Untersuchung der Prostata. Zusätzlich wurden in die Studie einige klinisch prostatagesunde Probanden (n=4) mit niedrigen PSA-Werten ausschließlich für den WHO-Vergleich der Testsysteme eingeschlossen. Alle Patienten unterzogen sich einer DRU und einer transrektalen Ultraschalluntersuchung (TRUS) mit Volumenmessung der Prostata. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme weder hormonell noch operativ vorbehandelt, noch litten sie unter einer anderen malignen Erkrankung. Die Diagnosen von 638 Probanden wurden durch Prostatastanzbiopsien gesichert, wobei von 311 der 337 PCa-Patienten zusätzlich das operativ entfernte Prostatektomiepräparat histologisch nach der TNM-Klassifikation und dem Gleason-Grading untersucht wurde. Die histologischen Untersuchungen erfolgten routinemäßig im Institut für Pathologie an der Charité Berlin.

Für den Methodenvergleich wurden alle verfügbaren Patientendaten verwendet, d.h. nur dort wurden auch die Daten der vier prostatagesunden Probanden ohne histologische Sicherung einbezogen, so dass insgesamt 642 Probanden für den Methodenvergleich ausgewählt wurden.

Für die Analyse des [-2]proPSA wurden lediglich Daten von 586 Patienten in die Untersuchung einbezogen, von denen 311 an einem PCa und 275 an einer BPH erkrankt waren. Die Beschränkung auf 586 Serumproben erklärt sich aus einem

repräsentativ gewähltem tPSA-Bereich sowie der eingeschränkten Verfügbarkeit der Serumproben.

3.1.1 Probenmaterial

Die Serumproben wurden vor der Stanzbiopsie bzw. mindestens 3-4 Wochen nach jeglichen Manipulationen an der Prostata (DRU, TRUS) entnommen, um mögliche Beeinflussungen der Ergebnisse zu vermeiden.

Nach der Abnahme wurden die Proben 10 Minuten bei 4° Celsius mit 1600G zentrifugiert und das aus dem Überstand gewonnene Serum anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Die Proben wurden erst am Tage der Messung bei Raumtemperatur aufgetaut und innerhalb von 3 Stunden analysiert.

3.2 Messungen

3.2.1 tPSA- und fPSA-Bestimmungen

Die Bestimmungen der fünf Parameter tPSA (WHO-Kalibration), tPSA (Hybritech-Kalibration), fPSA (WHO), fPSA (Hybritech) und [-2]proPSA (Research use only, RUO-Testkit) wurden an dem vollautomatischen Immunoassay-Gerät Access[®] (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) durchgeführt.

Die Messungen am Access[®] erfolgten bei den Parametern PSA-WHO, PSA Hybritech, fPSA-WHO und fPSA Hybritech mit der „Sandwich-Technik“. Die Proben werden hierbei zusammen mit einem Konjugat aus monoklonalen Antikörpern (Maus) mit fPSA bzw. tPSA, alkalischer Phosphatase sowie paramagnetischen Partikeln in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die paramagnetischen Partikel sind ihrerseits mit einem zweiten monoklonalen Anti-PSA-Maus-Antikörper beschichtet. Das totale bzw. freie PSA der Probe bindet sich an das immobilisierte monoklonale Anti-PSA der Festphase, während gleichzeitig das Konjugat aus Antikörpern und alkalischer Phosphatase mit verschiedenen Antigenbindungsstellen des totalen bzw. freien PSA reagiert. Nach Inkubation in einem Reaktionsgefäß werden die an die Festphase gebundenen Stoffe in einem Magnetfeld gehalten. Somit können die ungebundenen Stoffe durch Auswaschen entfernt werden. Daraufhin wird das chemilumineszente Substrat Lumi-Phos* 530 hinzugegeben und das bei der Reaktion erzeugte Licht mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Die erzeugte Lichtmenge ist der Konzentration von tPSA bzw. fPSA der Probe direkt proportional. Der Analytgehalt der Probe wird anhand einer gespeicherten Mehrpunktkalibrationskurve bestimmt.

Der Access[®] wurde mit herstellereigenem Kalibrationsmaterial geeicht und regelmäßig nach den Vorgaben des Herstellers mit Kontrollproben auf Präzision und Richtigkeit geprüft.

3.2.2 Messung des [-2]proPSA

Die Messung des [-2]proPSA wurde analog zum tPSA und fPSA in Einzelbestimmungen mit Hilfe des RUO-Testkits p2PSA durchgeführt. Die Kontrollmaterialien MAS Tumor Marker (Microgenics Corporation, Fremont, CA)

Levels I bis III und Lyphocheck Immunoassay Plus Control (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; cat. no. 40192) sowie ein hauseigener Serumpool wurden genutzt, um die Inter-Assay-Präzision für das p2PSA zu bestimmen.

3.3 Methodenvergleich

Zum Methodenvergleich wurden Serumproben von 642 Männern mit und ohne PCa mit den beiden verschiedenen tPSA- und fPSA-Kalibrierungen nach WHO und nach Beckman Coulter gemessen.

Die beiden PSA-Standards „Prostate-specific antigen [90:10], First International Standard, NIBSC Code 96/670, Version 03, 18 February 2004" und „Prostate-specific antigen [Free], First International Standard, NIBSC Code 96/668, Version 03, 18 February 2004" (im Folgenden als WHO-Standards 96/670 und 96/668 bezeichnet) wurden vom „National Institute for Biological Standards and Control“ (South Mimms, Großbritannien) erworben.

Proben mit einem tPSA von 2 und 10 µg/l und verschiedenen Anteilen des WHO-Standards 96/670 (der zu 90% ACT-PSA und zu 10% freies PSA enthielt) und des WHO-Standards 96/668 (der nur freies PSA enthielt) wurden in 20 mmol/l Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 1% humanem Albumin vermischt, um die Äquimolarität der Tests zu untersuchen.

Das Kontrollmaterial Access Hybritech PSA QC, Access Hybritech free PSA QC [Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA; cat. no. 37209 and 37219] und Lyphocheck Immunoassay Plus Control [Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; cat. no. 40192] sowie ein hauseigener Serumpool wurden für die Messungen genutzt.

3.4 Klinische Untersuchung

3.4.1 Prostatavolumenbestimmung

Das Prostatavolumen wurde von erfahrenen Untersuchern mittels TRUS bestimmt (Combison 330, Kretz Technik, Zipf, Österreich). Hierbei wurde die prolate Ellipsoid-Formel verwendet (Höhe x Breite x Länge x 0,52).

3.4.2 Digitale rektale Untersuchung

Alle Männer unterzogen sich einer DRU. Die Kriterien für einen unauffälligen, also negativen Befund (DRU=0) waren gute Abgrenzbarkeit, eine prall-elastische Struktur, eine glatte Oberfläche und keine Induration der Drüse, auch wenn diese vergrößert war. Als auffällig und damit positiv bzw. karzinomsuspekt (DRU=1) galten Drüsen mit Induration, Verhärtung und Knotenbildung.

3.4.3 Histologie

Alle 337 PCa wurden mit 6- bis 12-facher Stanzbiopsie histologisch gesichert. Bei 26 der Patienten erfolgten anschließend die hormonelle Therapie und/oder die Strahlentherapie bzw. eine aktive Überwachung. Alle 311 verbliebenen PCa-Patienten wurden laparoskopisch radikal prostatektomiert. Das Tumorstadium dieser 311 Patienten wurde nach dem revidiertem TNM-System von 2002 festgelegt. Es ergaben sich folgende pathologische T-Stadien der 311 Prostatektomiepräparate: pT1, n=7; pT2, n=227; pT3, n=76; pT4, n=1. Die pathologische Gleason-Summe (GS) war GS 4, n=4; GS 5, n=35; GS 6, n=88; GS 7, n=137; GS 8, n=32; GS 9, n=14; und GS 10, n=1. Die Gruppen mit dem Gleason Score ≤ 6 , 3+4, 4+3 und ≥ 8 beinhalteten damit insgesamt 127, 116, 21 und 47 PCa Patienten.

Bei 123 der 311 PCa-Patienten erfolgte zusätzlich eine laparoskopische pelvine Lymphadenektomie. Kein Patient hatte dabei Lymphknotenmetastasen (pN0, n=123), noch waren andere Metastasen vor der Therapie nachweisbar.

Die BPH, chronische Prostatitis bzw. der fehlende Nachweis einer Prostataabnormalität wurde bei allen 301 Patienten ohne Malignitätsnachweis ebenfalls durch Gewebeproben gesichert. Hierbei erfolgte auch eine 6- bis 12-fache TRUS-gestützte Prostatabiopsie. In der Gruppe der 275 Patienten ohne Malignität in der Biopsie und einer unauffälligen DRU, deren Daten im Rahmen der proPSA-Messung ausgewertet wurden, unterzogen sich 158 einer transurethralen Resektion der Prostata. Bei 29 Patienten wurde aufgrund eines sehr großen Prostatavolumens eine offene Adenomektomie durchgeführt.

3.5 ANN

Mit Hilfe der MATLAB Neuronal Network Toolbox (The Mathworks, Natick, Mass. USA) wurden die verschiedenen ANN-Modelle für die tPSA-Bereiche von 2-10 µg/l aufgebaut. Unter verschiedenen Möglichkeiten wurden zwei Netzwerkmodelle ausgewählt (99). Auf die Eingänge des einen wurden ausschließlich Laborparameter, wie PSA, %fPSA, p2PSA/fPSA (im Folgenden %p2PSA genannt), und das Patientenalter gegeben, beim anderen kam ein zusätzlicher Eingang für das Prostatavolumen hinzu. Die Nutzung von drei verborgenen Neuronen wurde für optimal befunden, und das Ausgangsneuron beschrieb die Wahrscheinlichkeit des PCa. Eine Überanpassung wurde mittels der Bayesian regularisation während des Trainings des ANN vermieden, welche Teil des Software-Pakets von MATLAB ist. Vorteilhaft ist dabei, dass bei dieser Trainings-Methode kein Validierungsdatensatz erforderlich ist, während das ANN trainiert wird (95).

Die interne Validierung dieser ANN erfolgte mit der Leave-one-out- (LOO) Methode, einem Spezialfall der k-fachen Kreuzvalidierung. Bei einem Stichprobenumfang von N Patienten wird N mal jeweils ein Patient mit dem aus N-1 Patienten trainierten ANN getestet. Gerade bei kleineren Patientenkollektiven ist diese Validierungstechnik empfehlenswert. Die genutzte LOO-Trainingsmethode erwies sich somit auch als vorteilhaft gegenüber der vormals genutzten zehnfachen Kreuzvalidierung (96;100).

Um die Wichtigkeit jedes einzelnen Parameters für die Klassifizierung mit dem ANN-Modell objektiv darzustellen, wurde als neuer Begriff die „Importance“ eingeführt. Die „Importance“ zeigt an, in welchem Maße ein Eingangsparameter zur Klassifikationsleistung des ANN-Modells beiträgt. Zu ihrer Bestimmung wurde jeder Parameter einmal ausgewählt und zufällig auf das Patientenkollektiv verteilt, während alle anderen Parameter unverändert blieben. Dieser Datensatz wurde auf das zuvor trainierte ANN-Modell gegeben, dessen Klassifikationsleistung wurde mit Hilfe der AUC bestimmt und mit der AUC des ANN-Modells ohne zufällige Verteilung dieses Parameters verglichen. Je größer die Differenz in der Klassifikationsleistung (der AUC) bei zufälliger Anordnung eines Parameters war, desto stärker war sein Einfluss innerhalb des ANN auf die AUC. Für die LR wird die „Importance“ eines jeden Parameters mit dem Wald-Koeffizienten beschrieben.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen und die Erstellung der Graphen erfolgten mit den statistischen Softwareprogrammen MedCalc[®] Version 9.0.1.0 (MedCalc Software, Belgien), GraphPad Prism[®] 4.03 (GraphPad Software, USA) und Excel 2003 für Windows (Microsoft Excel 2003, 11.5612.5606, Microsoft Office Professional Edition 2003).

Für den Methodenvergleich wurden Verfahren nach Passing-Bablok ([101](#)) und Bland-Altman benutzt. Die diagnostische Bewertung der Parameter tPSA, %fPSA, [-2]proPSA und der Quotienten [-2]proPSA/fPSA (%p2PSA), [-2]proPSA/tPSA und [-2]proPSA/(%fPSA) erfolgte mittels ROC-Analyse ([102](#)). Es wurden sowohl die AUC als auch die Grenzwerte bei 90%-iger und 95%-iger Sensitivität miteinander verglichen ([103](#)).

Die Signifikanz wurde definiert als $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Bei der Bewertung des proPSA erfolgte die Auswertung der Daten von insgesamt 586 Patienten. Davon hatten 275 Männer keinen Hinweis auf Malignität in der Prostatastanzbiopsie (engl.: no evidence of malignancy; als NEM bezeichnet), 311 Männer waren an einem PCa erkrankt. Die NEM-Patienten hatten ein mittleres Alter von $67,2 \pm 7,01$ Jahren und ein mittleres Prostatavolumen von $59,7 \text{ cm}^3$. Das durchschnittliche Alter der PCa-Patienten betrug $62,1 \pm 5,63$ Jahre, während das mittlere Prostatavolumen in dieser Gruppe bei $41,1 \text{ cm}^3$ lag. Die ermittelten PSA-Werte im Gesamtkollektiv reichten von $0,26 \text{ µg/l}$ bis $29,5 \text{ µg/l}$ bei einem Mittelwert von $5,55 \text{ µg/l}$.

Der Altersmedian aller Patienten belief sich auf 65 Jahre, bei den Karzinompatienten auf 63 und bei den NEM-Probanden auf 67 Jahre. Im Bereich des tPSA von $2-10 \text{ µg/l}$ lag der Altersmedian bei 64 Jahren, der Median der an PCa Erkrankten betrug 63 und der Median der NEM-Probanden ebenfalls 67 Jahre. Der Median der Prostatavolumina des Gesamtkollektivs lag bei 44 cm^3 , bei den Patienten mit PCa bei 40 cm^3 und bei Patienten mit BPH bei 53 cm^3 . Tabelle 1 bietet eine Übersicht über die Verteilung der tPSA-Werte des Patientenkollektivs.

Tabelle 1: Übersicht über die PCa- und NEM-Probanden in den beiden durchgeführten Studien zum Kalibrierungsvergleich und zum [-2]proPSA aufgeteilt nach Patienten mit PCa bzw. ohne Malignität in den jeweiligen tPSA-Bereichen.

tPSA (µg/l)	Studie: Kalibrationsvergleich				Studie: [-2]proPSA		
	Alle	PCa	NEM	Gesunde	Alle	PCa	NEM
< 1	29	12	14	3	13	7	6
1-2	57	16	40	1	53	16	37
2-10	487	275	212		475	264	211
10-20	63	32	31		42	23	19
> 20	6	2	4		3	1	2
Alle	642	337	301	4	586	311	275

4.2 ProPSA

4.2.1 Analytische Daten zum neuen p2PSA-Assays

Bisher gab es noch keine Daten über das neue p2PSA-Testsystem von Beckman Coulter. Daher wurde die analytische Genauigkeit des neuen Testsystems unter Festlegung der Detektionsgrenze bestimmt. Die Präzision innerhalb und zwischen den jeweiligen Assays wurde ermittelt, indem Versuche unter künstlichem Zusatz von proPSA durchgeführt wurden (Spiking-Experimente). Mithilfe dieser „Spiking-Experimente“ konnten ebenfalls Aussagen zur analytischen Wiederherstellung, der Linearität, der Kalibrierung des Tests und möglicher Interferenzen getroffen werden.

Die untere Detektionsgrenze des [-2]proPSA im p2PSA-Assay liegt bei 2,27 ng/l. Dieser Wert wurde aus 136 Messungen mit dem Null-Kalibrator ermittelt und auf der Basis des Mittelwertes mit der zweifachen Standardabweichung berechnet.

Die Inter-Assay-Präzision des p2PSA wurde in einem Zeitraum von elf Tagen in einem Serumpool (Median 17,5 ng/l, Variationskoeffizient (coefficient of variation; CV 4,4%) und drei Kontrollen (2,33 ng/l, CV 7,5%, 21,76 ng/l, CV 5,9% und 99,4 ng/l, CV 4,2%) mit bekannten [-2]proPSA-Konzentrationen von 2,59 ng/l; 23,54 ng/l und 107,7 ng/l bestimmt.

Zusätzlich ergaben die während der Experimente und zwischen den Experimenten durchgeführten Bestimmungen der CVs für die Intra-Assay-Präzision 5,63%, 2,14%, 2,45% und 2,03% sowie 7,99%, 4,54%, 3,58% und 3,1% für die Inter-Assay-Präzision (4 Proben mit [-2]proPSA Konzentrationen von 2,43 ng/l, 21,22 ng/l, 95,73 ng/l und 1637 ng/l).

Sechs Patientenserum wurden mit [-2]proPSA auf Zielwerte von 10, 75, 250, 2.000 und 4.500 ng/l beladen. Jedes beladene Patientenserum wurde unabhängig getestet und damit die lineare Regression zwischen erwartetem und tatsächlichem Wert berechnet. Der Anstieg (0,959 bis 1,055) und die durchschnittliche Wiederherstellung (92,75 bis 102,55%), die für jedes einzelne Serum beobachtet wurden, lagen in analytisch akzeptablen Bereichen.

4.2.2 Analyse des proPSA

Analysiert wurden die Daten von zwei verschiedenen Gruppen: erstere bestehend aus allen Patienten (initialer tPSA zwischen 0,26 µg/l und 29,5 µg/l) und die zweite aus Patienten mit einem PSA-Wert zwischen 2 µg/l und 10 µg/l. Das p2PSA unterschied signifikant zwischen NEM (Median: 9,71 ng/l) und PCa (Median: 10,78 ng/l, $p = 0,021$) in der ersten Gruppe (tPSA 0-30 µg/l), jedoch nicht in der zweiten Gruppe (tPSA 2-10 µg/l; $p = 0,065$).

Aus den gemessenen Parametern tPSA, fPSA und [-2]proPSA (durch den p2PSA-Test) wurden folgende Quotienten erstellt: %fPSA (fPSA/tPSA), %p2PSA (p2PSA/fPSA), p2PSA/tPSA und p2PSA/%fPSA (äquivalent zu $p2PSA * tPSA/fPSA$). Der Quotient p2PSA/tPSA konnte in keiner Form die Ergebnisse des p2PSA, %p2PSA oder p2PSA/%fPSA verbessern. Deshalb wurde auf eine Darstellung verzichtet. Die Werte von tPSA, %fPSA, %p2PSA, und p2PSA/%fPSA, unterschieden sich immer signifikant bei NEM- und PCa-Patienten, sowohl für den PSA-Bereich 0-30 µg/l als auch für den Bereich zwischen 2 und 10 µg/l (s. Tabelle 2). Der p-Wert belief sich bei dem Kollektiv 0-30 µg/l bei dem tPSA auf 0,0013, während er bei p2PSA bei 0,021 lag. In der Patientengruppe 2-10 µg/l des tPSA war der p-Wert beim tPSA 0,0203 und beim p2PSA 0,065 (kein signifikanter Unterschied). Für alle anderen Parameter (%fPSA, %p2PSA, p2PSA/%fPSA, Alter und Prostatavolumen) war der p-Wert stets $< 0,0001$ beim Vergleich von PCa und NEM.

In den Korrelationsanalysen zeigten sich innerhalb der zwei tPSA-Bereiche 0-30 µg/l und 2-10 µg/l sowohl starke Korrelationen zwischen p2PSA und tPSA ($r_s=0,47-0,63$, p immer $< 0,0001$), als auch zwischen p2PSA und fPSA ($r_s=0,62-0,72$). Bei der separaten Analyse von PCa und NEM bezüglich der Korrelation ergaben sich keine Unterschiede.

Tabelle 2: Mediane der PSA-Formen und ihrer Quotienten, Alter und Prostatavolumen der Patienten mit PCa, NEM und dem Gesamtkollektiv untersucht in den PSA-Bereichen 0-30 µg/l und 2-10 µg/l

tPSA Bereich	0-30 µg/l			2-10 µg/l		
	Alle (n=586)	PCa (n=311)	NEM (n=275)	Alle (n=475)	PCa (n=264)	NEM (n=211)
tPSA (µg/l)	5,22	5,47	4,9*	5,3	5,46	5,21*
%fPSA	16,15	13,24	20,44*	15,64	13,04	19,7*
p2PSA (ng/l)	10,16	10,78	9,71*	10,34	10,79	9,95
%p2PSA	13,76	16,78	11,57*	13,7	16,87	11,29*
p2PSA/%fPSA	0,683	0,857	0,467*	0,706	0,859	0,521*
Alter (in Jahren)	65	63	67*	64	63	67*
Volumen (cm ³)	44	40	53*	45	40	55*

* signifikanter Unterschied zum PCa in der entsprechenden Gruppe

4.2.3 ROC-Analyse und ANN-Auswertung

Im Rahmen der Auswertung wurden ROC-Kurven für alle Parameter inklusive tPSA, %fPSA, p2PSA, %p2PSA, p2PSA/%fPSA und dem Prostatavolumen erstellt. Des Weiteren wurden zwei ANN-Modelle und zwei LR-Modelle (jeweils mit und ohne Prostatavolumen) aufgebaut, um zu prüfen, inwieweit diese noch besser als alle o.g. Parameter zwischen PCa und NEM unterscheiden konnten. Die ANN- und LR-Modelle wurden ebenfalls in den PSA-Bereichen 0-30 und 2-10 µg/l erstellt.

Tabelle 3 zeigt alle gemessenen bzw. berechneten Parameter mit den entsprechenden Werten: AUC, Spezifität und Sensitivität bei 90% und 95% Sensitivität bzw. Spezifität im PSA-Bereich von 2 µg/l bis 10 µg/l. ANN und LR sind in dieser Tabelle jeweils ohne Verwendung des Prostatavolumens aufgeführt. Tabelle 3 beinhaltet zudem die Signifikanz-Angaben im Vergleich mit dem %fPSA sowie zusätzlich die p-Werte beim Vergleich der AUC. Sowohl hinsichtlich der AUC als auch bezüglich der Sensitivität und Spezifität der entsprechenden Grenzwerte schneiden tPSA und p2PSA als Einzelparameter jeweils signifikant schlechter ab als das %fPSA. Die Analyse der Prostatavoluminae verbessert verglichen mit dem tPSA die AUC auf 0,73. Allerdings konnte auch hier die Diskriminationsfähigkeit des %fPSA (AUC: 0,77) nicht übertroffen werden.

Von großer Bedeutung ist, dass sowohl das ANN- als auch das LR-Modell, (ohne Zuhilfenahme des Prostatavolumens) signifikant bessere AUC-Resultate in allen tPSA-Bereichen zeigten als %fPSA. Untereinander waren die AUC von ANN und LR aber nicht unterschiedlich.

In allen verglichenen Parametern (AUC, Sensitivität und Spezifität) war das ANN-Modell signifikant besser als das %p2PSA und der Quotient p2PSA/%fPSA. Das LR-Modell war dagegen bei einer Sensitivität von 90% nicht signifikant besser als %p2PSA und p2PSA/%fPSA. Auch bei beiden Spezifität-Grenzwerten erreichte die LR bei 90% Sensitivität keine Signifikanz zu %p2PSA und p2PSA/%fPSA. Der Übersichtlichkeit halber sind in Tabelle 3 lediglich die ANN- und LR-Modelle ohne Prostatavolumen aufgeführt. Es konnte keine Verbesserung der Ergebnisse bei Einschluss des Prostatavolumens in das ANN- oder LR-Modell festgestellt werden (AUC ANN 0,835 versus 0,85, LR 0,84 versus 0,835). Deshalb wird auf eine gesonderte Abbildung der ANN- und LR-Modelle mit Einschluss des Prostatavolumens verzichtet. Zudem unterschieden sich ANN- und LR-Modell im

tPSA-Bereich 0-30 $\mu\text{g/l}$ nicht von den Modellen im klinisch relevanten tPSA-Bereich von 2-10 $\mu\text{g/l}$, sodass auch hier auf eine separate Abbildung verzichtet wird.

Tabelle 3: ROC-Kurven-Analyse bezüglich der PSA-Formen, ihrer Derivate, der Prostatavolumina, der ANN- und LR-Modelle innerhalb des tPSA-Bereiches von 2-10 µg/l. Darstellung der AUC mit Konfidenzintervallen (CI), Spezifität und Sensitivität an den gegebenen Grenzwerten

Variable	AUC (CI)	p*	Spezifität bei		Sensitivität bei	
			90% Sens. (CI)	95% Sens. (CI)	90% Spez. (CI)	95% Spez. (CI)
tPSA	0,562 (0,51-0,61)#	<0,0001	22,7 (18,1-28)#	11,4 (8-15,7)#	9,8 (7-13,4)#	4,9 (3-7,8)#
%fPSA	0,769 (0,73-0,81)	-	45,5 (39,7-51,4)	26,1 (21,1-31,5)	43,6 (38,4-48,8)	22,7 (18,6-27,4)
p2PSA	0,549 (0,50-0,60)#	<0,0001	12,3 (8,8-16,7)#	7,6 (4,8-11,3)#	12,1 (9-16)#	7,6 (5,1-10,9)#
%p2PSA	0,779 (0,74-0,82)	0,33	41,7 (36-47,6)	17,5 (13,4-22,4)	47,0 (41,8-52,2)	30,3 (25,7-35,3)
p2PSA/%fPSA	0,749 (0,70-0,79)	0,068	41,7 (36-47,6)	22,7 (18,1-28)	36,7 (31,8-41,9)	22,0 (17,9-26,6)
Prostata- volumen (cm ³)	0,728 (0,68-0,77)#	0,0003	38,4 (32,8-44,2)#	26,1 (21,1-31,5)	23,9 (19,6-28,6)#	17,0 (13,4-21,3)#
ANN	0,846 (0,81-0,88)#	<0,0001	62,1 (56,3-67,6)#	45,5 (39,7-51,4)#	56,1 (50,8-61,2)#	42,4 (37,3-47,7)#
LR	0,835 (0,80-0,87)#	<0,0001	53,1 (47,2-58,9)#	41,2 (35,5-47,1)#	56,8 (51,6-61,9)#	33,3 (28,5-38,4)#

* p-Werte für jeden Parameter im Vergleich zum %fPSA

Signifikanter Unterschied zu %fPSA

Bei Nutzung der „Importance“ der unterschiedlichen Eingangsparameter für die Klassifikationsleistung der ANN-Modelle ergaben sich wichtige Zusammenhänge. Das Randomisieren der Parameter Alter, tPSA oder Prostatavolumen verkleinerte die AUC der jeweiligen ANN nur leicht ($p > 0,05$) im Vergleich zu demjenigen ANN (AUC 0,85), bei dem kein Parameter randomisiert wurde. Dieser Zusammenhang lässt darauf schließen, dass diese Parameter offenbar nur geringen Einfluss auf die Trennschärfe (Klassifikationsleistung) innerhalb des ANN-Modells haben. Als hingegen das %fPSA randomisiert eingesetzt wurde, verringerte sich die AUC signifikant von 0,85 auf 0,8 ($p = 0,0002$). Beim randomisierten %p2PSA fiel die AUC um den größten Betrag auf 0,74. Somit hat das %p2PSA den größten Einfluss auf die Trennschärfe des ANN-Modells. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den erhaltenen Wald-Koeffizienten bei der Nutzung des LR-Modells mit und ohne Prostatavolumen. In den LR- und ANN-Modellen ohne Berücksichtigung des Prostatavolumens hat jeweils PSA den kleinsten und %p2PSA den größten Einfluss auf die Fähigkeit der Unterscheidung zwischen PCa und NEM innerhalb des Modells. Ein ANN ohne den Parameter %p2PSA zeigt mit 0,80 ebenfalls eine signifikant geringere AUC als das ANN mit %p2PSA (Abb. 2).

Um zusätzlich die wichtige diagnostische Verbesserung speziell bei hohen Sensitivitäten zu zeigen, sind die Spezifitäten für %fPSA, %p2PSA sowie das ANN- und LR-Modell bei einer Sensitivität zwischen 85 und 100% in Abb. 3 aufgetragen. Interessanterweise konnte die höchste diagnostische Effizienz des ANN-Modells (Summe der Sensitivität und Spezifität geteilt durch 2) nicht nur an einem speziellen Punkt, sondern innerhalb der Spezifität zwischen 70 % und 62% (Daten teilweise in Abb. 3 zu sehen) und in einer Sensitivitätsregion zwischen 85 % und 100% gezeigt werden.

Bei der Analyse von p2PSA und seinen Quotienten fiel zudem ein deutliches Potenzial des %p2PSA und p2PSA/%fPSA auf, aggressive PCa mit einem Gleason Score ≥ 7 ausfindig zu machen sowie zwischen Tumoren der Stadien pT2 und pT3 zu unterscheiden. Während %fPSA bereits in der Lage war, in beiden tPSA-Bereichen signifikant zwischen Gleason Score < 7 und ≥ 7 PCa ($p = 0,004$ und $0,008$) zu unterscheiden, erreichten %p2PSA ($p = 0,0008$ und $< 0,0001$) und p2PSA/%fPSA ($p < 0,0001$ und $0,0003$) deutlichere Signifikanzstufen. P2PSA ist in beiden PSA-Bereichen zwischen pT2 und pT3 signifikant unterschiedlich, aber

%p2PSA und p2PSA/%fPSA erreichen eine bessere Signifikanzstufe ($p < 0,0001$ bis $0,0015$).

Abb. 2: ROC-Kurven für tPSA, %fPSA, ANN ohne %p2PSA (nur Alter, tPSA und %fPSA), LR und ANN mit den jeweiligen AUCs von 0,56; 0,77; 0,8; 0,84 und 0,85

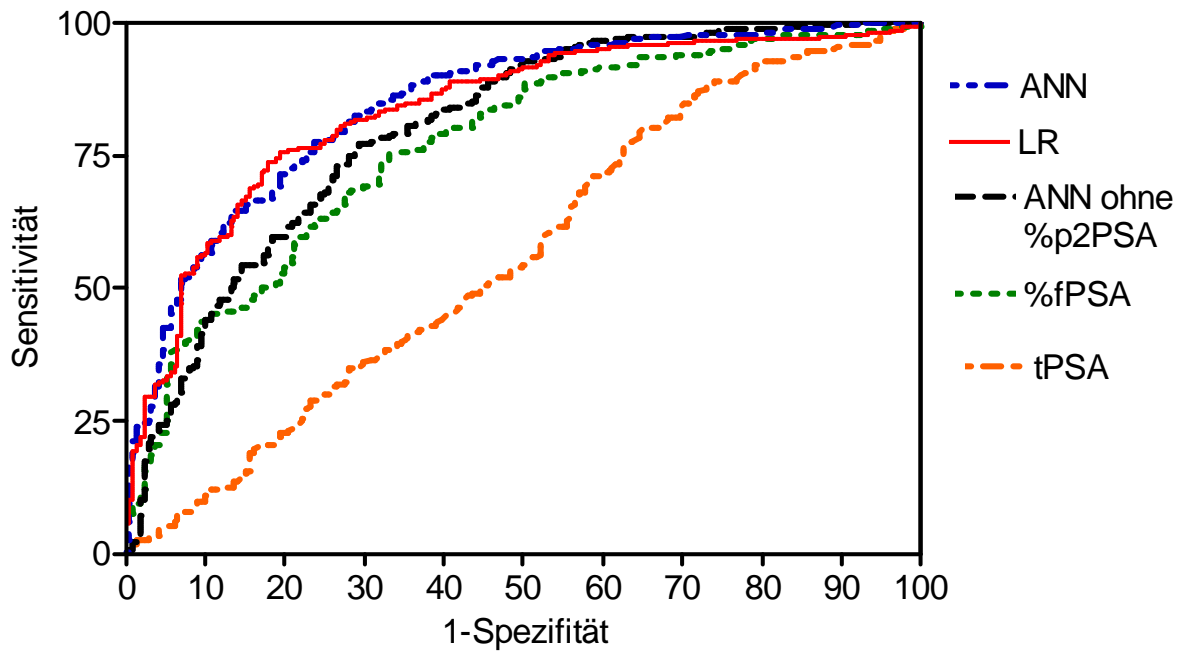
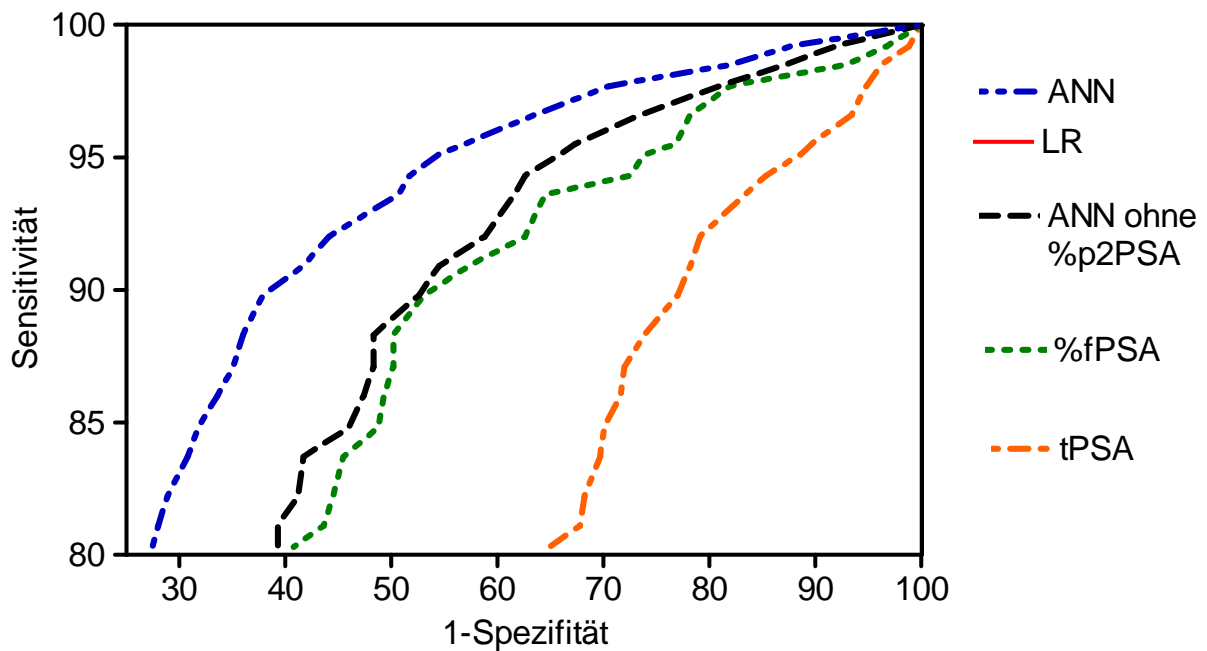


Abb. 3: Partielle ROC-Kurven für tPSA, %fPSA, ANN ohne %p2PSA (nur tPSA, %fPSA und Alter), LR und ANN bei Sensitivitäten zwischen 80 und 100%. Dieses Diagramm zeigt eine generelle Verbesserung der Spezifität um 15-20% beim ANN-Modell verglichen mit %fPSA



4.3 Methodenvergleich

4.3.1 Analytische Präzision der Hybritech und WHO kalibrierten PSA und fPSA Testsysteme

Die auf konventionellem Weg kalibrierten Access Hybritech Immunoassays wurden bereits in einigen vorangegangenen Studien untersucht ([104;105](#)).

Die neue optionale WHO-adaptierte Test-Kalibration funktioniert mit den gleichen Reagenzien und unterscheidet sich lediglich in Hinsicht auf die Anpassung an die zwei WHO-Standards 96/670 und 96/668 anstelle des hauseigenen Hybritech-Kalibrators prEN ISO 17511. Tabelle 4 zeigt, dass die Präzision beider tPSA und fPSA- Systeme gut miteinander vergleichbar waren.

Tabelle 4: Präzision zwischen den Versuchsläufen des Hybritech kalibrierten tPSA (tPSA-Hyb) und fPSA (fPSA-Hyb) sowie des WHO kalibrierten tPSA (tPSA-WHO) und fPSA (fPSA-WHO) ^a

Kontrollmaterial	Traditionelle Hybritech-Kalibration				Neue WHO-Kalibration			
	tPSA-Hyb (µg/l)	CV (%)	fPSA-Hyb (µg/l)	CV (%)	tPSA-WHO (µg/l)	CV (%)	fPSA-WHO (µg/l)	CV (%)
Access Kontrollen ^b								
Level I (n=14)	1,01	2,1	1,02	3,2	0,80	3,4	0,78	2,6
Level II (n=14)	15,7	2,5	12,7	2,2	11,8	2,4	10,1	2,6
Level III (n=14)	88,5	1,6	-	-	69,3	2,4	-	-
Lyphocheck ^c (n=14)	3,57	2,4	2,26	4,0	2,72	2,1	1,72	2,9
Serumpool (n=12)	7,61	2,8	1,15	6,7	5,77	2,4	0,90	6,2

^a Daten repräsentieren Mittelwerte und Variationskoeffizienten (CV) mit der Anzahl der Versuchsläufe.

^b Kontrollmaterialien: Access Hybritech PSA QC und freies PSA QC (cat. no. 37209 and 37219) von Beckman Coulter.

^c Kontrollmaterial: Lyphocheck Immunoassay Plus Control (cat. no. 40192) von den Bio-Rad Laboratorien.

tPSA-Hyb und fPSA-Hyb: totales und freies PSA gemessen mit der traditionellen Hybritech-Kalibration

tPSA-WHO und fPSA-WHO: totales und freies PSA gemessen mit der neuen Access WHO-Kalibration; CV, Variationskoeffizient (coefficient of variation)

4.3.2 Äquimolarität des tPSA WHO Tests

Die Äquimolarität des WHO tPSA-Tests wurde anhand von Proben, die den WHO-Standards 96/968 und 86/970 entsprechen, getestet. Die tPSA-Konzentrationen von 2 µg/l und 10 µg/l enthielten jeweils sechs verschiedene Konzentrationen von fPSA (10, 20, 30, 50, 80, 100%). Mittels Dreifachbestimmungen wurde eruiert, ob die Konzentration von fPSA einen Einfluss auf die tPSA-Konzentration ausübt. Abbildung 4 zeigt, dass die Konzentrationen von fPSA innerhalb der Probe die Messergebnisse nicht beeinflussten. Der Anstieg der linearen Regression wich nicht von Null ab. Somit ist auch die Äquimolarität des WHO-tPSA-Tests nachgewiesen.

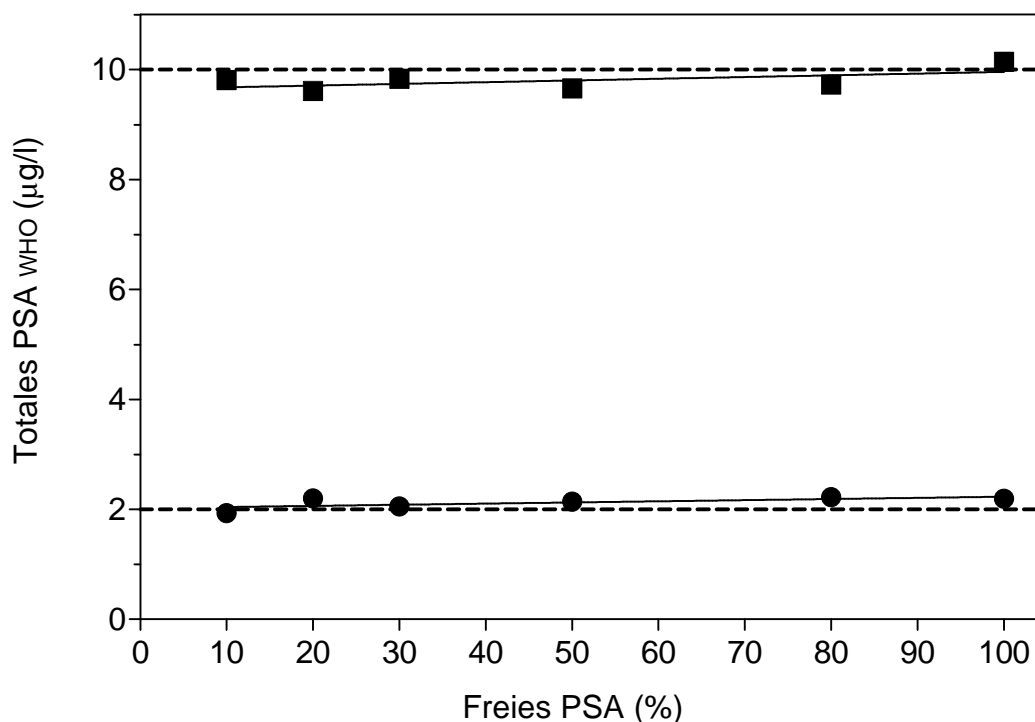


Abb. 4:

PSA Molekularplots der neuen Access WHO-tPSA-Kalibrierung im Vergleich zum PSA-WHO-Standard. TPSA-Konzentrationen von 2 und 10 µg/l, bereitet aus den WHO-PSA-Standards 96/668 und 96/970 mit verschiedenen Anteilen von fPSA, gemessen als Dreifachbestimmungen und als Mittelwerte dargestellt. Der Anstieg (mit 95% Konfidenzintervall in Klammern) lag bei 0,002 (-0,001 bis 0,005) für 2 µg/l und bei 0,003 (-0,003 bis 0,009) für 10 µg/l.

4.3.3 Proben der Studie in bestimmten PSA-Bereichen

In Tabelle 5 ist eine Übersicht aller tPSA-, fPSA- und %fPSA-Mediane mit den beiden Test-Kalibrierungen dargestellt. Während bei dem tPSA-WHO und fPSA-WHO-Test ca. 20-25% geringere Werte als beim tPSA-Hybritech und fPSA-Hybritech-Test verzeichnet wurden, unterschieden sich die %fPSA-Werte der beiden Kalibrierungen jedoch nicht.

Tabelle 5 tPSA-, fPSA- und %fPSA-Mediane in den jeweiligen Gruppen, basierend auf der Messung nach der traditionellen Hybritech-Kalibration und dem neuen WHO-Standard.

Studiengruppe			
Variable	Alle Patienten (n=641)	PCa-Patienten (n=336)	NEM-Patienten (n=305)
Total PSA (µg/l)			
tPSA-Hyb	5,27 (0,26-29,5)	5,61 (0,46-29,5)	4,9 (0,26-28,4)
tPSA-WHO	4,03 (0,21-23,2)	4,31 (0,36-23,2)	3,7 (0,21-20,8)
Freies PSA (µg/l)			
fPSA-Hyb	0,77 (0,02-8,44)	0,70 (0,07-7,98)	0,86 (0,02-8,44)
fPSA-WHO	0,60 (0,02-6,72)	0,55 (0,05-6,58)	0,67 (0,02-6,72)
%fPSA (%)			
%fPSA-Hyb	16,2 (3,65-57,4)	13,3 (3,65-53,7)	20,5 (6,39-57,4)
%fPSA-WHO	16,2 (3,96-56,9)	13,3 (3,96-56,9)	20,8 (6,4-56,4)

Mediane mit (Messbereich). Signifikante Unterschiede sind zwischen PSA-Hyb und tPSA-WHO als auch zwischen fPSA-Hyb und fPSA-WHO vorhanden, jedoch nicht zwischen den %fPSA-Medianen.

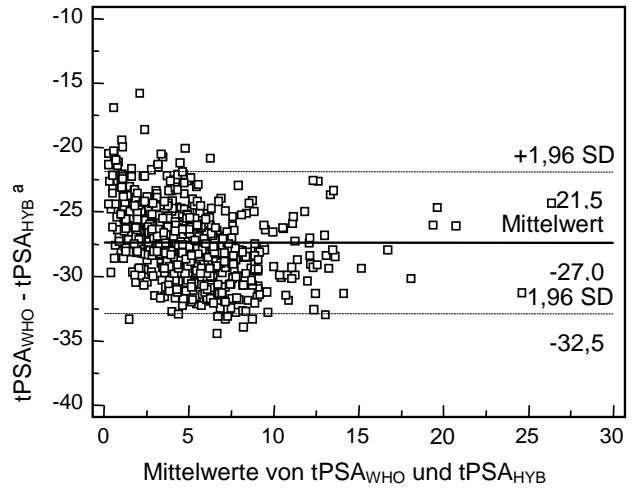
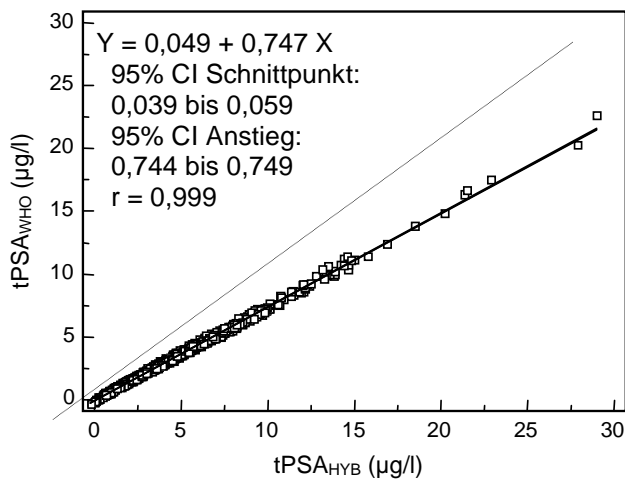
4.3.4 Methodenvergleich

Die Methodenvergleiche unter Zuhilfenahme der Regression nach Passing-Bablok und Bland-Altman sind in Abbildung 5 aufgezeigt (101). Separate Regressionsanalysen für PCa- und NEM-Patienten wurden aufgrund sehr ähnlicher Regressionsgleichungen nicht gezeigt.

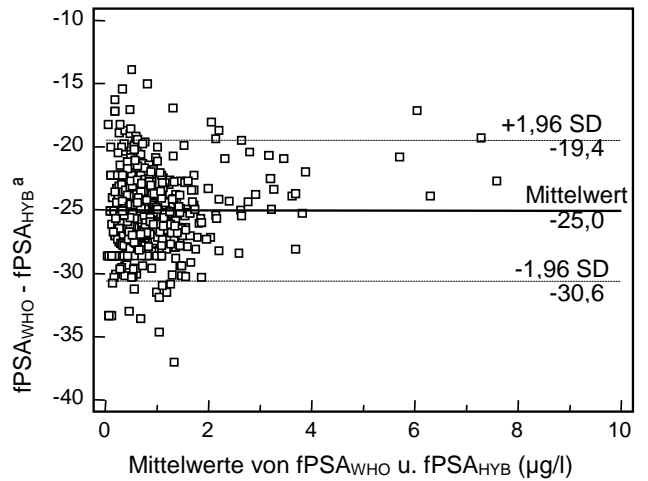
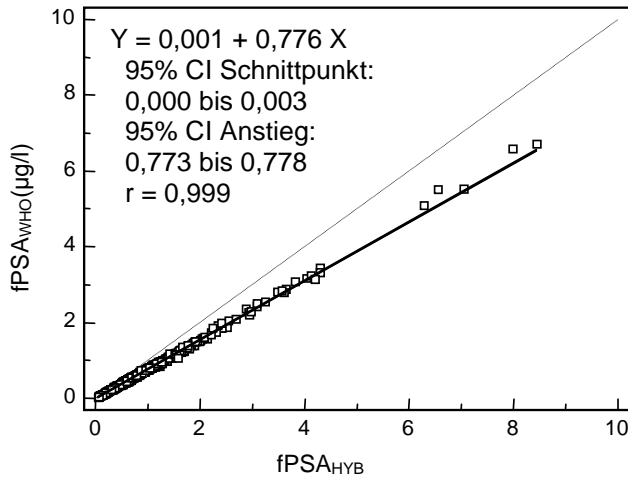
Daher beinhalten alle Berechnungen die kombinierten Datensätze aus beiden Patientengruppen. Die Anstiege, die Regressionsgleichungen und ebenso die prozentualen Änderungen in den Bland-Altman-Plots waren für tPSA und fPSA in beiden Kalibrierungsvergleichen sehr ähnlich (Abb. 5a, b). Die Korrelation zwischen den tPSA- und fPSA-Konzentrationen beider Kalibrierungen war mit 0,999 fast mit 1 identisch. Die Korrelation zwischen den %fPSA-Werten betrug 0,996. Bei Gleichsetzung der tPSA- und fPSA-Werte nach Hybritech als 100% ergaben die arithmetischen Mittelwerte nach WHO-Kalibrierung 76,2% (SD: 2,2%) und 77,0 (SD: 2,4%) verglichen mit der traditionellen Hybritech-Kalibrierung. Die Konsequenz aus dieser starken Übereinstimmung von tPSA und fPSA der verschiedenen Kalibrierungen ist, dass die %fPSA-Werte, die mit der WHO-Kalibrierung gemessen wurden, praktisch unverändert bleiben, wenn man sie mit denen aus der Hybritech-Kalibrierung vergleicht (102,2% versus 100%, siehe Abb. 5c).

Abb. 5: Passing-Bablok (jeweils links) und Bland-Altman-Plots (jeweils rechts) für (A) tPSA, (B) fPSA und (C) %fPSA gemessen mit dem WHO kalibrierten Tests im Vergleich zu den traditionellen Hybritech kalibrierten Tests. Die Test-Charakterisierungen sind in den jeweiligen Abbildungen eingefügt. CI: Konfidenzintervall SD: Standardabweichung

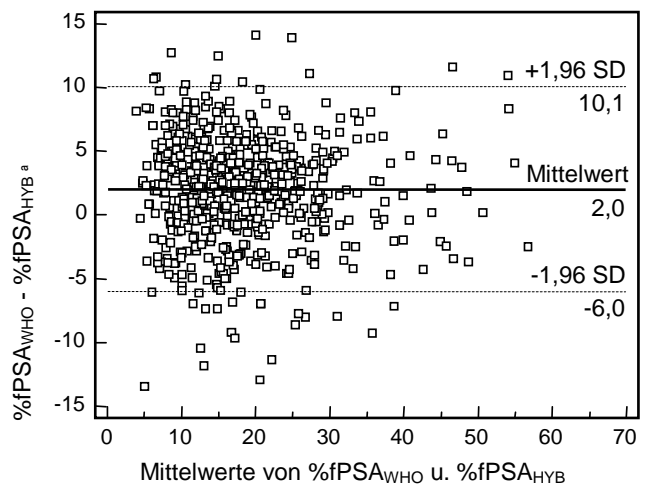
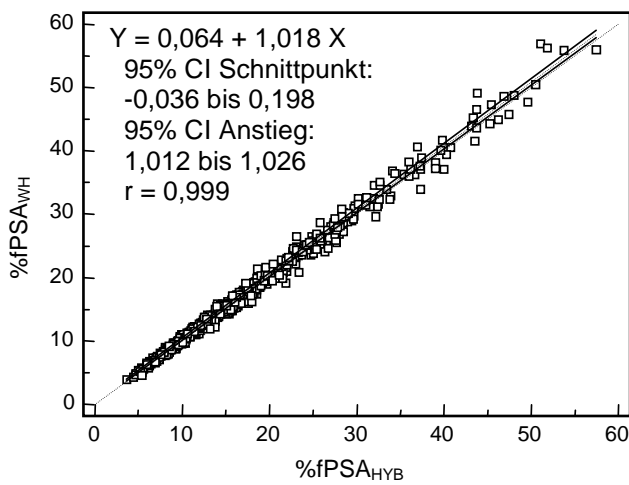
a tPSA WHO vs. tPSA Hybritech



b fPSA WHO vs fPSA Hybritech



c %fPSA WHO vs %fPSA Hybritech



4.3.5 Diagnostische Genauigkeit

Zum Vergleich der diagnostischen Genauigkeit der Tests wurden ROC-Kurven-Analysen durchgeführt. Dabei waren die ROC-Kurven für tPSA und %fPSA, gemessen nach Hybritech- und WHO-Kalibrierung, in hohem Maße kongruent. Die AUC für tPSA-Hybritech (0,58) und tPSA-WHO (0,58) zeigten keinerlei Unterschiede. Bei einer Sensitivität von 95% ergab sich eine Spezifität von 9,8% bzw. 9,5% und zeigte somit auch keinen statistisch signifikanten Unterschied. Für %fPSA konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen beiden Kalibrierungen hinsichtlich der AUC festgestellt werden (jeweils 0,75). Die Spezifität bei 95% belief sich auf 22,6% für %fPSA-Hybritech und auf 21,6% für %fPSA-WHO, der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

5. Diskussion

5.1 ProPSA

Die vorliegende Studie wurde mit Hilfe des p2PSA-Testsystems durchgeführt, um erstmals an einer größeren Population unter Berücksichtigung multivariater Auswertemodelle die diagnostische Aussagekraft des [-2]proPSA zu evaluieren. Gegenstand der Untersuchungen war die Bewertung der Spezifität des [-2]proPSA und seiner Quotienten für die verbesserte Diagnostik des PCa sowie der Einsatz dieser Quotienten innerhalb von ANN-Modellen. Bei der Studie handelte es sich um eine retrospektive Kohortenstudie. Zusätzliches Augenmerk lag hierbei auf der diagnostischen Aussagekraft des [-2]proPSA bezüglich seiner Detektion des aggressiven PCa. Der Methodenvergleich zwischen der traditionellen Hybritech-Kalibrierung und der neuen WHO-Kalibrierung mit dem Access 2000 für die Parameter tPSA, fPSA und %fPSA wird im nächsten Kapitels diskutiert.

Diese Studie wurde im Einklang mit den „Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies“ geplant, durchgeführt und ausgewertet (106).

Zunächst zeigte die analytische Bewertung des neuen p2PSA-Tests, dass vor allem die Präzision innerhalb und zwischen den Testläufen wie auch die analytische Genauigkeit absolut vergleichbar mit schon bestehenden Testsystemen wie dem tPSA und fPSA war. Ein großer Vorteil des p2PSA-Assays von Beckman Coulter gegenüber dem bereits eingeführten [-2]proPSA-Assay von Catalona et al. ist zum einen, dass der Access die Untersuchung der Proben vollautomatisch durchführt (46). Im Vergleich zu manuell durchgeführten Messungen sind die bessere Reproduzierbarkeit und der schnellere Probendurchsatz nur einige von mehreren Vorteilen. Zum anderen konnten bei einer Nachweisgrenze unter 3 ng/l auch proPSA-Werte in Proben mit geringsten tPSA Konzentrationen gemessen werden.

Mit Hilfe von fast 600 Patienten konnte der klinische Nutzen des proPSA erstmals an einer größeren Kohorte evaluiert werden. Alle Patienten hatten dabei eine histopathologisch gesicherte Diagnose. Als alleiniger Biomarker zeigte das p2PSA lediglich in dem Patientenkollektiv mit tPSA 0-30 µg/l signifikant höhere Werte bei PCa-Patienten als bei NEM-Patienten. Mithilfe des p2PSA als Einzelparameter ist sowohl gegenüber dem tPSA als auch dem %fPSA keine Verbesserung der PCa-Detektion möglich (Tabelle 2).

Innerhalb des tPSA-Bereichs von 2-10 µg/l gab es nur eine geringe Tendenz zu signifikant höheren p2PSA-Werten bei PCa-Patienten ($p = 0,065$). Allerdings waren diese höheren p2PSA-Werte der PCa-Patienten immer nur dann sichtbar, wenn auch das tPSA > 2 µg/l war. Interessanterweise sind diese Daten konträr zu bereits bestehenden Studien mit dem manuellen [-2]proPSA-Testsystem, in denen höhere proPSA-Konzentrationen in einer Studie bei PCa-Patienten, in einer anderen Studie jedoch bei NEM-Patienten gefunden wurde (107). Weitere Studien zum proPSA, welche sich allerdings der Detektion des [-5, -7]proPSA widmeten, ([-5, -7]proPSA Assay, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zeigten ebenfalls signifikant unterschiedliche proPSA-Konzentrationen zwischen PCa- und NEM-Patienten, jedoch nur in einem tPSA-Bereich von 4 bis 10 µg/l (108). Andere Studien berichten lediglich über eine Erhöhung des proPSA bei NEM-Patienten, jedoch nicht über eine Verbesserung der diagnostischen Aussagekraft durch das [-5, -7]proPSA (109;110).

Die Analyse der drei [-2]proPSA-Quotienten dieser vorliegenden Arbeit, p2PSA/tPSA, p2PSA/fPSA und p2PSA/%fPSA, zeigte, dass mit p2PSA/tPSA gegenüber dem %fPSA kein diagnostischer Gewinn möglich ist. Daher wurden diese Daten ausgespart.

Mit Hilfe der beiden anderen Quotienten, p2PSA/fPSA (%p2PSA) und p2PSA/%fPSA, konnte jedoch deutlich signifikant unterschieden werden zwischen PCa und NEM (siehe Tabelle 2). Dies bestätigt eine frühere Studie der Forschungsgruppe Catalona et al. (111), wo gezeigt werden konnte, dass der Quotient von [-2]proPSA/fPSA die größte AUC innerhalb der tPSA-Gruppe 2-4 µg/l bei Auswertung der ROC-Kurven hatte.

Innerhalb der Gruppe mit einem tPSA von 4-10 µg/l zeigte der Quotient aus allen proPSA-Formen (kombinierte Summe von [-2]proPSA, [-4]proPSA und [-5, -7]proPSA) nur minimal bessere Resultate als der Quotient [-2]proPSA/fPSA(111).

Sokoll et al. zeigten mit den ersten Untersuchungen des neuen automatisierten p2PSA-Testsystems an 123 Patientenseren, dass %p2PSA mit 0,69 die größte AUC erreichte, gefolgt von %fPSA mit einer AUC von nur 0,61 (89). Dieses steht im Gegensatz zu den eigenen Daten, wo zwischen %p2PSA, p2PSA/%fPSA und dem klinischen Routineparameter %fPSA nicht zwischen PCa und NEM unterschieden wurde. Der Grund hierfür könnte möglicherweise darin

liegen, dass %fPSA in der eigenen Untersuchungsgruppe bereits gut zwischen der PCa- und der NEM-Gruppe diskriminierte (AUC 0,77). Ursächlich hierfür könnte die Tatsache sein, dass die eigene NEM-Gruppe bereits zu zwei Dritteln aus klinisch behandlungsbedürftigen BPH-Patienten bestand. Das %fPSA scheint besser zwischen BPH- und PCa-Patienten zu unterscheiden als z.B. zwischen PCa- und NEM-Patienten in einer Screening-Population. Ungeachtet dessen muss jeder neue Parameter für die Detektion des PCa neben dem tPSA mit dem %fPSA verglichen werden. Diese Forderung nach Bewertung neuer Marker nur im Vergleich mit dem bestmöglichen aktuellen Parameter der PCa Diagnostik ist unumgänglich (112). Das %fPSA zeigte in einer bedeutenden prospektiven Studie eine signifikant verbesserte Unterscheidung zwischen PCa und NEM im Vergleich zum tPSA mit einem Spezifitätsgewinn von 20% (79).

Die Anwendung des %p2PSA in einem ANN war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. In der ersten multizentrischen ANN-Studie von Stephan et al. (96) im Jahre 2002 an 1.188 Patienten mit einem PSA zwischen 2 und 20 µg/l konnte das ANN mit Hilfe des Parameters %fPSA die Spezifität des %fPSA von 23% auf 35% bei einer 95%-igen Sensitivität erhöhen. Betrachtet man nur den tPSA-Bereich 4-10 µg/l, so war sogar eine Verbesserung der Spezifität von 21% auf 41% sichtbar (96). Es gibt mehrere Probleme der Vergleichbarkeit der verschiedenen o.g. ANN- und LR-Modelle. Zum einen werden die Testsysteme in verschiedenen tPSA-Bereichen angewendet, zum anderen werden in verschiedenen Laboratorien auch unterschiedliche tPSA- und fPSA-Testsysteme genutzt. Dies lässt eine direkte Vergleichbarkeit kaum zu. In einer Studie an fast 4.500 Patienten aus fünf verschiedenen urologischen Zentren mit fünf unterschiedlichen tPSA- und fPSA-Testsystemen zeigte sich, dass die Berücksichtigung des jeweiligen Testsystems für die Vergleichbarkeit und den optimalen Einsatz in einem ANN notwendig waren (97). Die Aussagekraft auf LR basierender Nomogramme sowie ANN-Modelle war bereits Gegenstand einiger Studien. Während LR-basierte Nomogramme Vorteile gegenüber den alleinigen PSA-Bestimmungen zeigten (113), postulierte eine Arbeitsgruppe sogar einen Vorteil der LR gegenüber ANN-Modellen bezüglich der Genauigkeit der Ergebnisse (114). Andere Arbeitsgruppen belegen hingegen einen Vorteil der ANN gegenüber der LR (94;95). Eine umfangreiche Übersichtsarbeit zum direkten Vergleich aller LR- und ANN-Modelle zur Detektion des PCa wurde von Schröder und Kattan veröffentlicht (115).

Eine der wichtigsten Erkenntnisse in dieser Studie ergab sich nach der Erstellung eines ANN-Modells lediglich mit Laborparametern und dem Alter der Patienten jedoch ohne die Verwendung der Prostatavoluminae als Variable.

Interessanterweise zeigte das LOO-ANN-Modell mit Bayesischer Regulation immer leicht bessere Werte als das jeweilige LR-Modell. Eine einzige Ausnahme wurde bei einer Spezifität von 90% beobachtet. Ein weiterer Vorteil des ANN war das signifikant bessere Abschneiden gegenüber %p2PSA und p2PSA/%fPSA in allen verglichenen Werten, während mithilfe des LR-Modells keine Signifikanz zum %p2PSA oder p2PSA/%fPSA bei 90% Sensitivität erreicht werden konnte. Das LR-Modell war ebenso nicht in der Lage, die Sensitivität des %p2PSA an den Spezifitätsgrenzwerten zu verbessern.

Wie bereits erwähnt, verbesserte die Einbeziehung des Prostatavolumens in die LR- und ANN-Modelle die diagnostische Aussagekraft derselben nicht. Dieses mag begründet sein in einer relativ starken Korrelation zwischen Prostatavolumen und %fPSA ($r_s = 0,35$) und %p2PSA ($r_s = -0,44$). Zur verbesserten PCa-Diagnostik innerhalb von ANN-Modellen sollten eher Parameter genutzt werden, die ihrerseits nicht direkt mit dem tPSA, %fPSA oder %p2PSA korrelieren. Ungeachtet dessen bringt ein ANN-Modell, in das die Prostatavolumenbestimmung nicht mit eingeschlossen ist, verschiedene Vorteile. Bei der TRUS-basierten Prostatavolumenbestimmung gibt es, wie eingangs erwähnt, eine große Variabilität. Die damit verbundene schlechte Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Werten könnte somit vermieden werden. Des Weiteren gäbe es dadurch für den Patienten keine Notwendigkeit mehr, sich der unangenehmen Prozedur des TRUS zu unterziehen, bevor nicht die Indikation zu einer Stanzbiopsie gestellt wurde.

In vorangegangenen Arbeiten der Gruppe um Stephan et al. hatte das Prostatavolumen einen hohen Einfluss auf die Ergebnisse (108;116).

Innerhalb des klinisch genutzten ANN „ProstataClass“ ist das Prostatavolumen ebenfalls ein wichtiger und notwendiger Parameter (96). Bislang war es nur teilweise und vor allem nur in spezifischen tPSA-Bereichen möglich, ANN-Modelle ohne Anwendung des Prostatavolumens zu erstellen. In einer Studie gelang dies in einer spezifischen Populationsgruppe (108), in anderen Studien konnten vom Prostatavolumen unabhängige ANN mit Hilfe der humanen Kallikreine 2 (117) oder 11 (118) erstellt werden. Auch die DRU hatte stets einen hohen Stellenwert zur Unterscheidung zwischen NEM und PCa (96;100). Sollte das neue p2PSA-

Testsystem als möglicher zukünftiger Screening-Test in Frage kommen, wird die Notwendigkeit, das Ergebnis der DRU zu kennen, gering sein. Um mögliche Einflüsse in dieser Hinsicht zu umgehen, wurden in diese Studie lediglich Patienten mit negativer DRU eingeschlossen.

Die Analyse von p2PSA und seinen Quotienten zeigte ein deutliches Potenzial des %p2PSA und p2PSA/%fPSA, aggressive PCa mit einem Gleason Score ≥ 7 bevorzugt zu entdecken. Das tPSA war hingegen nicht in der Lage, zwischen Gleason < 7 und ≥ 7 PCa zu unterscheiden. Während %fPSA in beiden tPSA-Bereichen signifikant zwischen Gleason < 7 und ≥ 7 PCa ($p = 0,004$ und $0,008$) unterschied, erreichten %p2PSA ($p = 0,0008$ und $< 0,0001$) und p2PSA/%fPSA ($p < 0,0001$ und $0,0003$) deutlichere Signifikanzstufen. Dies ist ein weiterer Vorteil des [-2]proPSA verglichen mit dem [-5, -7]proPSA-Testsystem, wo in zwei Studien keine Unterscheidung zwischen aggressiveren und weniger malignen PCa möglich war (110;119). Dieser Fakt unterstützt weiterhin die These, dass [-2]proPSA eher karzinomassoziiert sein könnte (42;120). Diese Fähigkeit des p2PSA, bevorzugt aggressive PCa und auch kapselüberschreitende Tumoren zu erfassen, ist ein Vorteil gegenüber dem %fPSA, obwohl weitere Studien diesen Zusammenhang erst bestätigen müssen.

Alle Berechnungen in dieser Studie erfolgten sowohl in der Gesamtpopulation (tPSA 0-30 $\mu\text{g/l}$) als auch im tPSA-Bereich 2-10 $\mu\text{g/l}$. Die Bildung in Subgruppen (2-4 und 4-10 $\mu\text{g/l}$) wurde für nicht sinnvoll erachtet, da der Grenzwert von 4 $\mu\text{g/l}$ als überholt betrachtet werden kann. Dies liegt begründet in der Detektionsrate von PCa bei niedrigen tPSA-Konzentrationen, welche auf ein ähnliches Risiko für ein PCa in den Bereichen 2-4 $\mu\text{g/l}$ (61) wie auch in der klassischen Grauzone von 4-10 $\mu\text{g/l}$ hindeuten.

Eine Studie mit fünf unterschiedlichen tPSA- und fPSA-Testsystemen von verschiedenen Herstellern zeigte relevante Auswirkungen auf klinische Entscheidungen zur Karzinomdetektion (121). Daher soll an dieser Stelle noch einmal betont werden, dass alle tPSA- und fPSA-Messungen in dieser Studie ausschließlich mit dem Access[®] (Fa. Beckman Coulter) vorgenommen worden sind. Durch die Benutzung von PSA-Testsystem-spezifischen ANN-Modellen können diese Unterschiede nur begrenzt, jedoch nicht komplett ausgeräumt werden (97;122).

Der Einsatz des [-2]proPSA innerhalb eines %fPSA-basierten ANN ist bisher noch nicht untersucht worden. Die kombinierte Nutzung von %fPSA und tPSA innerhalb eines LR-Modells hatte jedoch in den letzten Jahren bereits eine Spezifitätsverbesserung gegenüber dem %fPSA gezeigt (123;124). Die Nutzung von verschiedenen ANN-Modellen mit der Einarbeitung von Parametern wie tPSA, %fPSA und anderen klinischen Daten hat später eine weitere Verbesserung der Spezifität um 11 bis 49% gegenüber dem %fPSA gezeigt (93-95;100). Mit dem hier vorliegenden %p2PSA-basierten ANN konnte eine weitere Verbesserung der Spezifität (verglichen mit %fPSA allein) um 15-20% nachgewiesen werden. Diese Verbesserung basiert hauptsächlich auf %p2PSA, da es über den besten Wald-Koeffizienten beim LR-Modell und über die höchste „Importance“ innerhalb beider ANN-Modelle verfügt. Diese Steigerung der Spezifität gegenüber dem %fPSA um 15-20% ist vergleichbar mit den Resultaten des „ProstataClass“-ANN mit den Parametern Alter, tPSA, %fPSA, Prostatavolumen und DRU-Status (96). Der Vorteil des %p2PSA-basierten ANN liegt darin, dass auf die Nutzung des Prostatavolumens und des DRU-Status verzichtet werden kann, da diese ohnehin subjektive Parameter sind. Daher könnte p2PSA möglicherweise als Ersatzparameter für Prostatavolumen und DRU in zukünftigen ANN eingesetzt werden. Ein ausschließlich auf Laborparametern basierendes ANN wäre ein Vorteil für die zukünftige Nutzung. Dennoch ist es notwendig, diese vielversprechenden Resultate in anderen Kohortenstudien zu überprüfen.

Zusammenfassend zeigen die Daten mit dem neuen p2PSA Testsystem in der hier untersuchten Population gegenüber dem tPSA und %fPSA eine verbesserte Effizienz des %p2PSA und p2PSA/%fPSA, aggressive PCa zu detektieren. Allerdings konnte kein Vorteil des p2PSA als alleiniger Parameter zur Erkennung von PCa beobachtet werden. Die Nutzung des neuen p2PSA innerhalb eines %fPSA-basierten ANN ohne die Notwendigkeit der Eingabe des Prostatavolumens verbessert die Frühdiagnostik des PCa.

Bevor p2PSA allerdings als Routineparameter in zukünftigen ANN eingesetzt werden kann, müssen Folgestudien zum Beispiel in Screening-Populationen oder multizentrischen Kohorten diese Resultate bestätigen.

5.2 Methodenvergleich

Für die Früherkennung des PCa sind im Laufe der Zeit eine Vielzahl von tPSA- und fPSA-Tests entwickelt worden. Sie unterscheiden sich jedoch nicht nur hinsichtlich ihrer Messtechniken, sondern können sich innerhalb einer Technik auch in der Kalibrierung unterscheiden. Diese Unterschiede variieren untereinander zum Teil so stark, dass die verschiedenen Ergebnisse schwer vergleichbar sind und damit zu Fehlinterpretationen und möglicherweise falschen klinischen Entscheidungen führen können (121). Bedingt durch diese Problematik wurde bereits Mitte der 90er Jahre verstärkt auf eine internationale Standardisierung gedrängt, um eine bessere Vergleichbarkeit unter den einzelnen Testsystemen herzustellen (125). Vor allem die uneinheitlichen Kalibrierungen schienen für die differierenden Messergebnisse verantwortlich zu sein (126;127). Daraufhin wurden uniforme Referenzmaterialien entwickelt (98), wobei insbesondere die Kalibrierung mit dem WHO-Referenzmaterial und die Einführung weiterer äquimolarer Methoden die bessere Harmonisierung der PSA-Systeme erhoffen lassen (128;129). Ein häufiges Problem für den klinisch arbeitenden Arzt ist jedoch, dass über die Kalibrierung oder das Messsystem und die damit verbundenen Einschränkungen und Besonderheiten nur selten ausreichend Kenntnis vorhanden ist (127).

Das akkurate Angleichen der Kalibratorkonzentrationen eines jeden PSA-Tests an die WHO-PSA-Standards und die Äquimolarität jedes PSA-Tests sind zwei entscheidende Voraussetzungen, um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Ergebnisse zu verbessern (130). Mehrere unabhängige Studien haben gezeigt, dass es immer noch eine große Streuung zwischen den verschiedenen tPSA- und fPSA-Testsystemen gibt (131-134). Viele Hersteller haben daraufhin ihre tPSA- und fPSA-Testsysteme bereits nach WHO-Standards, dem erklärten „First International PSA Standard“ kalibriert.

Der manuelle Hybritech-Tandem-R-tPSA-Test und nachfolgend auch der Tandem-E tPSA-Test waren die ersten Messsysteme, die 1986 die Zulassung bei der „Food and Drug Administration“ erhielten und seither den „Goldstandard“ für andere PSA-Hersteller darstellten. Im Jahre 2000 entwickelte Beckman Coulter die Tandem-tPSA- und fPSA-Tests weiter zu vollautomatischen Immunoassays, durchführbar auf dem Access. Eine multizentrische Studie zu diesem Thema

bestätigte die Gleichwertigkeit der Messergebnisse zwischen manueller und vollautomatischer Prozedur (104). Kalibriert wurden beide Beckman Coulter Hybritech Tests (sowohl tPSA als auch fPSA) immer mit dem hauseigenen Kalibrator prEN ISO 17511, hergestellt aus reinem humanen PSA. Der konventionelle und weit verbreitete Grenzwert von 4 µg/l, altersbedingten Referenzwerten und Grenzwerte für die PSA-Dichte sowie die PSA-Velocity wurden anhand von Daten mit diesem Testsystem entwickelt (72;76;135;136).

Mitte der 1990er Jahre konnte gezeigt werden, dass das Hybritech-Kalibrierungsmaterial, welches mit einer Proteinquantifizierungstechnik der 1980er Jahre arbeitete, die PSA-Konzentrationen der Präparate stets unterschätzte und somit überhöhte PSA-Werte lieferte (137). Mehrere klinischen Empfehlungen und Leitlinien entwickelten sich allerdings aus einer Vielzahl von Studien mit dem „Goldstandard“ Hybritech-PSA-Testsystem. Die exzellente analytische Stabilität der Hybritech Assays führte dazu, dass die Firma (jetzt Beckman Coulter) ihre traditionelle Kalibrierung für tPSA und fPSA beibehielt. Die derzeitige Forderung nach größerer Übereinstimmung zwischen den von verschiedenen Herstellern produzierten PSA-Tests hat Beckman Coulter nun veranlasst, eine alternative WHO-gemäße Kalibrierung für ihre tPSA- und fPSA-Assays anzubieten. Dieses ist für die metrologische Rückführbarkeit und Vergleichbarkeit von PSA Testsystemen von Bedeutung. Parallel dazu wird Beckman Coulter aber weiterhin die konventionell kalibrierten Hybritech-tPSA- und fPSA-Testsysteme für jene Nutzer anbieten, die das bewährte tPSA- und fPSA-Testsystem v.a. für eine bessere Vergleichbarkeit im Verlauf beizubehalten wünschen.

Diese oben genannten Aspekte erforderten einen Vergleich der traditionellen Hybritech-kalibrierten tPSA- und fPSA-Testsysteme mit den neuen WHO-kalibrierten Testsystemen, um die analytische und klinische Bedeutung beider Kalibrierungen beurteilen zu können. In dieser vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Kalibrierungsvergleich an einer Population von 641 Männern vorgenommen. Die analytischen Parameter der beiden Testsysteme stimmten weitestgehend mit den Daten verschiedener Studien des tPSA und fPSA überein, deren Variationskoeffizient zumeist unter 5% lag (59;131). Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen kalibrierten Tests wurden nicht verzeichnet. Da der neue WHO-Kalibrator auf den gleichen Reagenzien basiert wie der traditionelle Access-Hybritech-Test, waren die äquivalenten Ergebnisse nicht überraschend.

Der PSA Molekularplot für den tPSA-WHO-Test (Abb. 4) zeigte unveränderte tPSA-Konzentrationen trotz verschiedener Zusätze des fPSA. Dieses ist eine weitere wichtige analytische Voraussetzung für zuverlässige PSA-Messungen, da nicht-äquimolare PSA-Tests bedingt durch die bevorzugte Erkennung von fPSA fälschlicherweise höhere tPSA-Konzentrationen mit steigenden fPSA-Werten messen (138). Vorangegangene Studien mit dem traditionellen Hybritech-Assay gaben eine Verzerrung der Äquimolarität von bis zu 10% an (104;132). Dabei wurde eine Abweichung von 10% als eine zu akzeptierende Verzerrung definiert (130). Entsprechend den Daten dieser Studie ohne wesentliche Abweichung des tPSA bei fPSA-Zusatz (siehe Abb. 4) sind die Voraussetzungen für zuverlässige Messungen von tPSA und fPSA durch die WHO-gemäße Kalibrierung des Access als erfüllt zu betrachten.

Für den Methodenvergleich wurden ausschließlich Patientenproben verwendet, da der Einsatz von artifiziellen Proben, wie in einem großen englischen Ringversuch publiziert (132), zusätzliche Fehler durch den Matrix-Effekt hervorrufen kann (139). Die Serumproben stammen von Männern mit und ohne PCa, um mögliche gruppenbezogene Fehler ebenfalls erkennen zu können. Hierbei zeigten sich jedoch keinerlei Differenzen bei separater Analyse der Serumproben. Für die Gesamtgruppe aller Patienten betrug die Korrelation zwischen den tPSA- und fPSA-Konzentrationen beider Kalibrierungen 0,999, während die %fPSA-Werte mit einem Wert von 0,996 korrelierten. Die Anstiege der Regressionslinien von 0,747 für tPSA und 0,776 für fPSA reflektieren die 76% und 77% der tPSA-WHO- und fPSA-WHO-Werte, wenn die traditionellen Hybritech-Werte als 100% betrachtet werden. Während beide WHO-kalibrierten Testsysteme (tPSA und fPSA) einen 25%-ig geringeren Messwert im Vergleich zu den Hybritech-kalibrierten Tests zeigten, gab es keine signifikante Veränderung des %fPSA-Wertes. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Studie von 2007 überein, in der an einer kleineren Population ebenfalls die Kalibrierungen nach Hybritech und WHO verglichen wurden (140). Der damit unveränderte Grenzwert für das %fPSA ist ein großer Vorteil für die klinische Nutzung, da in der Routineanwendung des %fPSA keine Veränderungen notwendig sind, unabhängig von der Kalibrierungsart.

Die ROC-Analyse für tPSA und %fPSA beider Testsysteme zeigte fast eine komplette Übereinstimmung der ROC-Kurven der verschiedenen Kalibrierungen. Diese Ergebnisse bedeuten, dass die diagnostische Genauigkeit durch die Nutzung

der WHO-Kalibrierung nicht verändert wird. Jedoch ist aufgrund der deutlich geringeren Konzentrationen ein neuer Grenzwert für die klinische Nutzung des tPSA-WHO notwendig. Obwohl die untersuchte Studiengruppe nicht repräsentativ für die Prävalenz des PCa in der Bevölkerung war, zeigen doch die schätzungsweise um 25% niedrigeren tPSA-Werte durch die neue Kalibrierung, welchen enormen Einfluss eine Werteverchiebung auf klinische Entscheidungen beispielsweise für oder gegen eine Prostatastanzbiopsie hat. Bei der Beibehaltung des tPSA Grenzwertes von 4 µg/l, der mit der Hybritech Kalibrierung eine Sensitivität von 76% aufweist, zeigt die Nutzung des gleichen Grenzwertes für die WHO Kalibrierung einer erniedrigten Sensitivität von lediglich 55%. Damit würden 21% der PCa Patienten nicht entdeckt werden. Ähnliche Effekte konnten in anderen Studien beobachtet werden (141-143).

In der urologischen Referenzpopulation dieser Arbeit wird mit dem neuen WHO-kalibrierten Testsystem bei einem Grenzwert des tPSA von 3 µg/l eine Sensitivität von 76% erreicht. Dieses Ergebnis korrespondiert mit den oben beschriebenen analytischen Vergleichsdaten. Erneut sei betont, dass die neuen WHO-kalibrierten tPSA- und fPSA-Assays den großen Vorteil haben, dass der resultierende Quotient %fPSA sich im Vergleich mit den traditionell kalibrierten Hybritech-Assays nicht verändert. Die klinische Bedeutsamkeit und dementsprechend auch die Nutzbarkeit der %fPSA-Grenzwerte bleibt hier erhalten, während in anderen Studien zwischen anderen Assay-Systemen Sensitivitätsunterschiede von bis zu 30% ermittelt werden konnten (121).

Ein möglicher Nachteil dieser retrospektiven Arbeit ist, dass lediglich bei -80 °C aufbewahrte Seren benutzt wurden, mit einer teilweise sehr langen Einlagerungsdauer (Abnahmedaten zwischen 2002 und 2006). Eine aktuelle Studie zu diesem Thema zeigt aber, dass eine längere Lagerung fast keinen Einfluss auf die Probenkonzentration hat. Dies bezieht sich auf Proben, die fünf Jahre bei -80 °C gelagert wurden (144). Prospektive Studien zur Vergleichbarkeit zwischen der Kalibration nach Hybritech und der nach WHO sind zum Ausschluss eines Lagerungseffektes notwendig. Die 25%-ig niedrigeren WHO-tPSA-Werte der eigenen Studie könnten möglicherweise bei Nutzung von anderen und prospektiven Daten eine leichte Verschiebung erfahren (145).

Der Vergleich äquimolarer WHO-kalibrierter Testsysteme von unterschiedlichen Herstellern zeigt enorme Unterschiede des tPSA und v.a. beim %fPSA (59;133;134). Quellen der Abweichung in den tPSA- und fPSA-

Konzentrationen und damit auch %fPSA Werten sind analytische, biologische und methodische Unterschiede sowie Antikörper- und Epitopspezifitäten und Affinitäten. Wie schon an anderer Stelle erwähnt ([139](#)), sollte daher der Begriff PSA-Harmonisierung anstelle von Standardisierung bevorzugt verwendet werden. Damit werden Fehlinterpretationen vermieden, die für alle WHO-kalibrierten tPSA-Testsysteme theoretisch identische Ergebnisse zeigen müssten.

Die neuen WHO-PSA-Kalibrierungen für das Access-Messsystem unterstützen eine verbesserte metrologische Rückführbarkeit aller tPSA- und fPSA-Testsysteme. Für den Wechsel von der Hybritech-Kalibrierung auf das neue WHO-kalibrierte Beckman Coulter Access Testsystem empfiehlt es sich, 3,0 µg/l als neuen klinischen Grenzwert zu nutzen. Eine leichte Verschiebung des optimalen Grenzwertes zu 3,1 oder 3,2 µg/l könnte sich aber aus weiteren Studien ergeben. Die Beibehaltung der %fPSA-Grenzwerte ist als positives Ergebnis dieses PSA- und fPSA-Vergleichs zu verzeichnen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Notwendigkeit, Ärzte über die Besonderheiten der Kalibrierung und die neuen Grenzwerte aufzuklären, um sicherzustellen, dass diese im klinischen Alltag bewusst genutzt und korrekt eingeschätzt werden.

6. Zusammenfassung

Jährlich werden in Deutschland etwa 58.500 bösartige Neubildungen der Prostata diagnostiziert. Das PCa ist nicht nur in Deutschland, sondern auch in den USA und vielen anderen westlichen Ländern die häufigste Krebserkrankung des Mannes.

Das PSA ist heute im klinischen Alltag der bedeutendste Marker in Bezug auf Diagnostik, Therapie und Verlauf des PCa. Ein gravierendes Problem stellt seine geringe Spezifität dar, die häufig zu unnötig durchgeführten Prostatastanzbiopsien führt. Speziell im Bereich zwischen 4-10 µg/l, der so genannten „Grauzone“, ist die Spezifität unzureichend. Das gehäufte gemeinsame Auftreten von BPH, Prostatitis und auch PCa führt oft zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen PSA-Werten im Serum. Konzepte zur Spezifitätserhöhung, wie beispielsweise die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit, PSA-Dichte und PSA-Verdopplungszeit, konnten die Spezifität jedoch nur teilweise verbessern.

Erstes Ziel dieser Studie war es, den neuen automatisierten [-2]proPSA (p2PSA)-Immunoassay auf seine Unterscheidungsfähigkeit zwischen Patienten mit und ohne PCa zu prüfen und diesen Test in einem ANN- und einem LR-basierten Modell einzusetzen.

Hierzu wurden die Seren von 311 PCa-Patienten und 275 NEM-Patienten mit einem tPSA von 0-30 µg/l mit Hilfe des Access-Immunoassay-Automaten auf die Parameter p2PSA, tPSA und fPSA untersucht. Des Weiteren erfolgte die Auswertung einer Patientensubgruppe von 264 PCa und 211 NEM im tPSA-Bereich von 2-10 µg/l. LR-Modelle und LOO-ANN-Modelle wurden mittels Bayesischer Regulierung unter Eingabe der Parameter tPSA, %fPSA, p2PSA/fPSA (%p2PSA), Alter und Prostatavolumen konstruiert und miteinander durch ROC-Kurven-Analyse verglichen.

Das p2PSA als alleiniger Marker konnte die Erkennung des PCa nicht verbessern, aber %p2PSA zeigte eine AUC von 0,78, welche in der Gruppe des tPSA von 2-10 µg/l vergleichbar mit der des %fPSA (0,77) war. Das ANN ohne den Parameter Prostatavolumen erreichte die höchste AUC (0,85) und die beste Spezifität (62% und 45,5%), verglichen mit %fPSA (45,5 und 26%) und %p2PSA (42% und 17,5%) bei einer Sensitivität von 90% und 95%. Dies beinhaltet besonders für die klinische Praxis große Vorteile, da die Vergleichbarkeit der Prostatavoluminae

großen Schwankungen unterliegt. Zusätzlich zeigten die Quotienten %p2PSA und p2PSA/%fPSA eine verbesserte Möglichkeit, aggressive PCa zu entdecken.

Damit kann zusammengefasst werden, dass der automatische p2PSA-Test eine neue Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen PCa und NEM darstellt. Insbesondere die Einarbeitung des neuen Parameters in ein ANN verbessert die diagnostische Voraussagekraft.

Zweites Ziel dieser Studie war der Methodenvergleich der tPSA- und fPSA-Kalibrierungen nach Hybritech und den neuem WHO-Standard. Bei Gleichsetzung der tPSA- und fPSA-Werte nach Hybritech mit 100% ergaben die Mittelwerte nach WHO-Kalibrierung 76% und 77% für die tPSA-WHO und fPSA-WHO Testsysteme, wobei das %fPSA unverändert blieb. Mit der neuen optionalen WHO-Kalibrierung wird eine bessere metrologische Rückführbarkeit ermöglicht und die Vergleichbarkeit zwischen den Testsystemen verbessert. Bei ca. 25% geringeren tPSA und fPSA-Werten ist eine Änderung des tPSA-Grenzwertes von 4 auf 3 µg/l unter Anwendung der neuen WHO-Kalibrierung bei Beibehalten des bisherigen %fPSA-Grenzwertes notwendig.

7. Literatur

1. Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Robert Koch Institut (Hrsg). Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. Robert Koch Institut 2006.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
3. Rodriguez C, Freedland SJ, Deka A, Jacobs EJ, McCullough ML, . Body mass index, weight change, and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:63-9.
4. McNeal JE. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 1978;15:340-5.
5. Song JM, Kim CB, Chung HC, Kane RL. Prostate-specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography: a meta-analysis for this diagnostic triad of prostate cancer in symptomatic korean men. *Yonsei Med J* 2005;46:414-24.
6. Han M, Partin AW, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Era specific biochemical recurrence-free survival following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2001;166:416-9.
7. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, 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* 1991;51:222-6.
8. Christensson A, Laurell CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem* 1990;194:755-63.
9. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, Lovgren T. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991;37:1618-25.
10. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999;162:293-306.
11. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008;8:268-78.
12. Lundwall A, Lilja H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett* 1987;214:317-22.

13. Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T. [Some physico-chemical characteristics of " -seminoprotein", an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII]. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1971;25:322-4.
14. Li TS, Beling CG. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertil Steril* 1973;24:134-44.
15. Sensabaugh GF. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci* 1978;23:106-15.
16. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. 1979. *J Urol* 2002;167:960-4.
17. Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput JA, Romijn JC, Trapman J. Characterization of the prostate-specific antigen gene: a novel human kallikrein-like gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:95-102.
18. Stephan C, Jung K, Lein M, Sinha P, Schnorr D, Loening SA. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1133-47.
19. Stephan C, Jung K, Lein M, Diamandis EP. PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. *Eur J Cancer* 2007;43:1918-26.
20. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001;22:184-204.
21. Watt KW, Lee PJ, M'Timkulu T, Chan WP, Loo R. Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:3166-70.
22. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 1987;80:281-5.
23. Luboldt HJ. Leitlinie zur PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (Früherkennung des Prostatakarzinoms), 2002. *der Urologe A* 2002;41:509-13.
24. Stenman UH. Prostate-specific antigen, clinical use and staging: an overview. *Br J Urol* 1997;79 Suppl 1:53-60.
25. Christensson A, Lilja H. Complex formation between protein C inhibitor and prostate-specific antigen in vitro and in human semen. *Eur J Biochem* 1994;220:45-53.
26. Wu JT, Zhang P, Liu GH, Wilson L. Development of an immunoassay specific for the PSA-ACT complex without the problem of high background. *J Clin Lab Anal* 1998;12:14-9.

27. Jung K, Brux B, Lein M, Knabich A, Sinha P, Rudolph B et al. 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* 1999;53:1160-7.
28. Lein M, Jung K, Elgeti U, Petras T, Stephan C, Brux B et al. Comparison of the clinical validity of free prostate-specific antigen, alpha-1 antichymotrypsin-bound prostate-specific antigen and complexed prostate-specific antigen in prostate cancer diagnosis. *Eur Urol* 2001;39:57-64.
29. Zhu L, Leinonen J, Zhang WM, Finne P, Stenman UH. Dual-label immunoassay for simultaneous measurement of prostate-specific antigen (PSA)-alpha1-antichymotrypsin complex together with free or total PSA. *Clin Chem* 2003;49:97-103.
30. Chen Z, Komatsu K, Prestigiacomo A, Stamey TA. Addition of purified prostate specific antigen to serum from female subjects: studies on the relative inhibition by alpha 2-macroglobulin and alpha 1-antichymotrypsin. *J Urol* 1996;156:1357-63.
31. Leinonen J, Zhang WM, Stenman UH. Complex formation between PSA isoenzymes and protease inhibitors. *J Urol* 1996;155:1099-103.
32. Zhang WM, Finne P, Leinonen J, Vesalainen S, Nordling S, Rannikko S, Stenman UH. Characterization and immunological determination of the complex between prostate-specific antigen and alpha2-macroglobulin. *Clin Chem* 1998;44:2471-9.
33. Vessella RL, Lange PH. Issues in the assessment of prostate-specific antigen immunoassays. An update. *Urol Clin North Am* 1997;24:261-8.
34. Zhang WM, Finne P, Leinonen J, Vesalainen S, Nordling S, Stenman UH. Measurement of the complex between prostate-specific antigen and alpha1-protease inhibitor in serum. *Clin Chem* 1999;45:814-21.
35. Finne P, Zhang WM, Auvinen A, Leinonen J, Maattanen L, Rannikko S et al. Use of the complex between prostate specific antigen and alpha 1-protease inhibitor for screening prostate cancer. *J Urol* 2000;164:1956-60.
36. Stephan C, Jung K, Brux B, Lein M, Sinha P, Schnorr D, Loening SA. ACT-PSA and complexed PSA elimination kinetics in serum after radical retropubic prostatectomy: proof of new complex forming of PSA after release into circulation. *Urology* 2000;55:560-3.
37. Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Marks LS et al. "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* 2000;55:41-5.
38. Canto EI, Singh H, Shariat SF, Lamb DJ, Mikolajczyk SD, Linton HJ et al. Serum BPSA outperforms both total PSA and free PSA as a predictor of prostatic enlargement in men without prostate cancer. *Urology* 2004;63:905-10.

39. Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG. Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer. *Keio J Med* 2003;52:86-91.
40. Steuber T, Nurmikko P, Haese A, Pettersson K, Graefen M, Hammerer P et al. Discrimination of benign from malignant prostatic disease by selective measurements of single chain, intact free prostate specific antigen. *J Urol* 2002;168:1917-22.
41. Haese A, Noldus J, Steuber T, Huland H, Lilja H. [Isoforms of free prostate-specific antigen]. *Urologe A* 2004;43:675-9.
42. Peyromaure M, Fulla Y, Debre B, nh-Xuan AT. Pro PSA : a "pro cancer" form of PSA? *Med Hypotheses* 2005;64:92-5.
43. Peter J, Unverzagt C, Krogh TN, Vorm O, Hoesel W. Identification of precursor forms of free prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. *Cancer Res* 2001;61:957-62.
44. Mikolajczyk SD, Grauer LS, Millar LS, Hill TM, Kumar A, Rittenhouse HG et al. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum. *Urology* 1997;50:710-4.
45. Mikolajczyk SD, Marker KM, Millar LS, Kumar A, Saedi MS, Payne JK et al. A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:6958-63.
46. Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ, Horninger W et al. Serum pro-prostate specific antigen preferentially detects aggressive prostate cancers in men with 2 to 4 ng/ml prostate specific antigen. *J Urol* 2004;171:2239-44.
47. Brawer MK. Screening for prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 2000;18:29-36.
48. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
49. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009;360:1310-9.
50. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009; 360; 1320-28.
51. Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol* 1995;154:407-13.
52. Semjonow A, Roth S, Hamm M, Rathert P. Re: Nontraumatic elevation of prostate specific antigen following cardiac surgery and extracorporeal cardiopulmonary bypass. *J Urol* 1996;155:295-6.

53. Tchetgen MB, Song JT, Strawderman M, Jacobsen SJ, Oesterling JE. Ejaculation increases the serum prostate-specific antigen concentration. *Urology* 1996;47:511-6.
54. Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. Down-regulation of prostate-specific antigen expression by finasteride through inhibition of complex formation between androgen receptor and steroid receptor-binding consensus in the promoter of the PSA gene in LNCaP cells. *Cancer Res* 1997;57:714-9.
55. Guess HA, Heyse JF, Gormley GJ. The effect of finasteride on prostate-specific antigen in men with benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1993;22:31-7.
56. van Iersel MP, Witjes WP, Thomas CM, Segers MF, Oosterhof GO, Debruyne FM. Review on the simultaneous determination of total prostate-specific antigen and free prostate-specific antigen. *Prostate Suppl* 1996;7:48-57.
57. Jung K, Meyer A, Lein M, Rudolph B, Schnorr D, Loening SA. 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* 1998;159:1595-8.
58. Soletormos G, Semjonow A, Sibley PE, Lamerz R, Petersen PH, Albrecht W et al. Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences for clinical practice. *Clin Chem* 2005;51:1342-51.
59. Stephan C, Klaas M, Muller C, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Interchangeability of measurements of total and free prostate-specific antigen in serum with 5 frequently used assay combinations: an update. *Clin Chem* 2006;52:59-64.
60. Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK. 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* 1997;277:1452-5.
61. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004;350:2239-46.
62. Carter HB. Prostate cancers in men with low PSA levels--must we find them? *N Engl J Med* 2004;350:2292-4.
63. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992;267:2215-20.
64. Brawer MK, Beatie J, Wener MH, Vessella RL, Preston SD, Lange PH. Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen: results of the second year. *J Urol* 1993;150:106-9.

65. Smith DS, Catalona WJ. Rate of change in serum prostate specific antigen levels as a method for prostate cancer detection. *J Urol* 1994;152:1163-7.
66. Nixon RG, Wener MH, Smith KM, Parson RE, Strobel SA, Brawer MK. Biological variation of prostate specific antigen levels in serum: an evaluation of day-to-day physiological fluctuations in a well-defined cohort of 24 patients. *J Urol* 1997;157:2183-90.
67. Komatsu K, Wehner N, Prestigiacomo AF, Chen Z, Stamey TA. Physiologic (intraindividual) variation of serum prostate-specific antigen in 814 men from a screening population. *Urology* 1996;47:343-6.
68. Berger AP, Deibl M, Strasak A, Bektic J, Pelzer AE, Klocker H et al. 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* 2007;69:134-8.
69. Yu X, Loeb S, Roehl KA, Han M, Catalona WJ. The association between total prostate specific antigen concentration and prostate specific antigen velocity. *J Urol* 2007;177:1298-302.
70. Schroder FH, Roobol MJ, van der Kwast TH, Kranse R, Bangma CH. Does PSA velocity predict prostate cancer in pre-screened populations? *Eur Urol* 2006;49:460-5.
71. Loeb S, Roehl KA, Nadler RB, Yu X, Catalona WJ. Prostate specific antigen velocity in men with total prostate specific antigen less than 4 ng/ml. *J Urol* 2007;178:2348-52.
72. Benson MC, Whang IS, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, Olsson CA, Cooner WH. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol* 1992;147:815-6.
73. Babaian RJ, Fritsche HA, Evans RB. Prostate-specific antigen and prostate gland volume: correlation and clinical application. *J Clin Lab Anal* 1990;4:135-7.
74. Thon WF, Gadban F, Truss MC, Kuczyk M, Hartmann U, Jonas U. Prostate-specific antigen density--a reliable parameter for the detection of prostate cancer? *World J Urol* 1996;14:53-8.
75. Stamey TA, Kabalin JN, McNeal JE, Johnstone IM, Freiha F, Redwine EA, Yang N. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients. *J Urol* 1989;141:1076-83.
76. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, Lieber MM. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA* 1993;270:860-6.
77. Anderson JR, Strickland D, Corbin D, Byrnes JA, Zweiback E. Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen. *Urology* 1995;46:54-7.

78. Partin AW, Criley SR, Subong EN, Zincke H, Walsh PC, Oesterling JE. Standard versus age-specific prostate specific antigen reference ranges among men with clinically localized prostate cancer: A pathological analysis. *J Urol* 1996;155:1336-9.
79. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A et al. 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* 1998;279:1542-7.
80. Jung K, Stephan C, Lein M, Henke W, Schnorr D, Brux B et al. Analytical performance and clinical validity of two free prostate-specific antigen assays compared. *Clin Chem* 1996;42:1026-33.
81. Woodrum DL, Brawer MK, Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC. Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer. *J Urol* 1998;159:5-12.
82. Jung K, Stephan C, Elgeti U, Lein M, Brux B, Kristiansen G et al. Molecular forms of prostate-specific antigen in serum with concentrations of total prostate-specific antigen <4 microg/L: are they useful tools for early detection and screening of prostate cancer? *Int J Cancer* 2001;93:759-65.
83. Walz J, Haese A, Scattoni V, Steuber T, Chun FK, Briganti A et al. Percent free prostate-specific antigen (PSA) is an accurate predictor of prostate cancer risk in men with serum PSA 2.5 ng/mL and lower. *Cancer* 2008;113:2695-703.
84. Roehl KA, Antenor JA, Catalona WJ. Robustness of free prostate specific antigen measurements to reduce unnecessary biopsies in the 2.6 to 4.0 ng./ml. range. *J Urol* 2002;168:922-5.
85. Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse HG, Marks LS, Song W et al. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Res* 2000;60:756-9.
86. Nurmikko P, Vaisanen V, Piironen T, Lindgren S, Lilja H, Pettersson K. Production and characterization of novel anti-prostate-specific antigen (PSA) monoclonal antibodies that do not detect internally cleaved Lys145-Lys146 inactive PSA. *Clin Chem* 2000;46:1610-8.
87. Khan MA, Partin AW, Rittenhouse HG, Mikolajczyk SD, Sokoll LJ, Chan DW, Veltri RW. Evaluation of proprostate specific antigen for early detection of prostate cancer in men with a total prostate specific antigen range of 4.0 to 10.0 ng/ml. *J Urol* 2003;170:723-6.
88. Sokoll LJ, Chan DW, Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ et al. Proenzyme psa for the early detection of prostate cancer in the 2.5-4.0 ng/ml total psa range: preliminary analysis. *Urology* 2003;61:274-6.
89. Sokoll LJ, Wang Y, Feng Z, Kagan J, Partin AW, Sanda MG et al. [-2]proenzyme prostate specific antigen for prostate cancer detection: a

- national cancer institute early detection research network validation study. *J Urol* 2008;180:539-43.
90. Dybowski R, Gant V. Artificial neural networks in pathology and medical laboratories. *Lancet* 1995;346:1203-7.
 91. Rosenblatt F. The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychol Rev* 1958;65:386-408.
 92. Snow PB, Smith DS, Catalona WJ. Artificial neural networks in the diagnosis and prognosis of prostate cancer: a pilot study. *J Urol* 1994;152:1923-6.
 93. Babaian RJ, Fritsche H, Ayala A, Bhadkamkar V, Johnston DA, Naccarato W, Zhang Z. Performance of a neural network in detecting prostate cancer in the prostate-specific antigen reflex range of 2.5 to 4.0 ng/mL. *Urology* 2000;56:1000-6.
 94. Djavan B, Remzi M, Zlotta A, Seitz C, Snow P, Marberger M. Novel artificial neural network for early detection of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:921-9.
 95. Finne P, Finne R, Auvinen A, Juusela H, Aro J, Maattanen L et al. Predicting the outcome of prostate biopsy in screen-positive men by a multilayer perceptron network. *Urology* 2000;56:418-22.
 96. Stephan C, Cammann H, Semjonow A, Diamandis EP, Wymenga LF, Lein M et al. Multicenter evaluation of an artificial neural network to increase the prostate cancer detection rate and reduce unnecessary biopsies. *Clin Chem* 2002;48:1279-87.
 97. Stephan C, Xu C, Cammann H, Graefen M, Haese A, Huland H et al. Assay-specific artificial neural networks for five different PSA assays and populations with PSA 2-10 ng/ml in 4,480 men. *World J Urol* 2007;25:95-103.
 98. Rafferty B, Rigsby P, Rose M, Stamey T, Gaines DR. Reference reagents for prostate-specific antigen (PSA): establishment of the first international standards for free PSA and PSA (90:10). *Clin Chem* 2000;46:1310-7.
 99. Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, Lein M, Schrader M, Deger S et al. A [-2]proPSA-based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases. *Prostate* 2009;69:198-207.
 100. Stephan C, Jung K, Cammann H, Vogel B, Brux B, Kristiansen G et al. An artificial neural network considerably improves the diagnostic power of percent free prostate-specific antigen in prostate cancer diagnosis: results of a 5-year investigation. *Int J Cancer* 2002;99:466-73.
 101. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.

102. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143:29-36.
103. Kairisto V, Poola A. Software for illustrative presentation of basic clinical characteristics of laboratory tests--GraphROC for Windows. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1995;222:43-60.
104. Laffin RJ, Chan DW, Tanasijevic MJ, Fischer GA, Markus W, Miller J et al. Hybritech total and free prostate-specific antigen assays developed for the Beckman Coulter access automated chemiluminescent immunoassay system: a multicenter evaluation of analytical performance. *Clin Chem* 2001;47:129-32.
105. Blijenberg BG, Lilja H, Neels H, Stenman UH. Quality assessment for prostate-specific antigen (PSA) in relation to ERSPC: report of the PSA committee. *BJU Int* 2003;92 Suppl 2:66-70.
106. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1180-4.
107. Khan MA, Sokoll LJ, Chan DW, Mangold LA, Mohr P, Mikolajczyk SD et al. Clinical utility of proPSA and "benign" PSA when percent free PSA is less than 15%. *Urology* 2004;64:1160-4.
108. Stephan C, Meyer HA, Kwiatkowski M, Recker F, Cammann H, Loening SA et al. A (-5, -7) proPSA based artificial neural network to detect prostate cancer. *Eur Urol* 2006;50:1014-20.
109. Bangma CH, Wildhagen MF, Yurdakul G, Schroder FH, Blijenberg BG. The value of (-7, -5)pro-prostate-specific antigen and human kallikrein-2 as serum markers for grading prostate cancer. *BJU Int* 2004;93:720-4.
110. Lein M, Semjonow A, Graefen M, Kwiatkowski M, Abramjuk C, Stephan C et al. A multicenter clinical trial on the use of (-5, -7) pro prostate specific antigen. *J Urol* 2005;174:2150-3.
111. Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ, Amirkhan A et al. 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* 2003;170:2181-5.
112. Kattan MW. Judging new markers by their ability to improve predictive accuracy. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:634-5.
113. Hernandez DJ, Han M, Humphreys EB, Mangold LA, Taneja SS, Childs SJ et al. Predicting the outcome of prostate biopsy: comparison of a novel logistic regression-based model, the prostate cancer risk calculator, and prostate-specific antigen level alone. *BJU Int* 2009;103:609-14.
114. Shariat SF, Capitanio U, Jeldres C, Karakiewicz PI. Can nomograms be superior to other prediction tools? *BJU Int* 2009;103:492-5.

115. Schroder F, Kattan MW. The comparability of models for predicting the risk of a positive prostate biopsy with prostate-specific antigen alone: a systematic review. *Eur Urol* 2008;54:274-90.
116. Stephan C, Xu C, Brown DA, Breit SN, Michael A, Nakamura T et al. Three new serum markers for prostate cancer detection within a percent free PSA-based artificial neural network. *Prostate* 2006;66:651-9.
117. Stephan C, Jung K, Soosaipillai A, Yousef GM, Cammann H, Meyer H et al. Clinical utility of human glandular kallikrein 2 within a neural network for prostate cancer detection. *BJU Int* 2005;96:521-7.
118. Stephan C, Meyer HA, Cammann H, Nakamura T, Diamandis EP, Jung K. Improved prostate cancer detection with a human kallikrein 11 and percentage free PSA-based artificial neural network. *Biol Chem* 2006;387:801-5.
119. Bangma CH, Wildhagen MF, Yurdakul G, Schroder FH, Blijenberg BG. The value of (-7, -5)pro-prostate-specific antigen and human kallikrein-2 as serum markers for grading prostate cancer. *BJU Int* 2004;93:720-4.
120. Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, Linton HJ, Millar LS, Marker KM et al. Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clin Chem* 2004;50:1017-25.
121. Stephan C, Kramer J, Meyer HA, Kristiansen G, Ziemer S, Deger S et al. Different prostate-specific antigen assays give different results on the same blood sample: an obstacle to recommending uniform limits for prostate biopsies. *BJU Int* 2007;99:1427-31.
122. Stephan C, Xu C, Finne P, Cammann H, Meyer HA, Lein M et al. Comparison of two different artificial neural networks for prostate biopsy indication in two different patient populations. *Urology* 2007;70:596-601.
123. Carlson GD, Calvanese CB, Partin AW. An algorithm combining age, total prostate-specific antigen (PSA), and percent free PSA to predict prostate cancer: results on 4298 cases. *Urology* 1998;52:455-61.
124. Virtanen A, Gomari M, Kranse R, Stenman UH. Estimation of prostate cancer probability by logistic regression: free and total prostate-specific antigen, digital rectal examination, and heredity are significant variables. *Clin Chem* 1999;45:987-94.
125. Stamey TA. Second Stanford Conference on International Standardization of Prostate-Specific Antigen Immunoassays: September 1 and 2, 1994. *Urology* 1995;45:173-84.
126. Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM. Standardization of PSA determinations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1995;221:45-51.
127. Semjonow A, Brandt B, Oberpenning F, Roth S, Hertle L. Discordance of assay methods creates pitfalls for the interpretation of prostate-specific antigen values. *Prostate Suppl* 1996;7:3-16.

128. Blijenberg BG, Storm BN, van Zelst BD, Kruger AE, Schroder FH. New developments in the standardization of total prostate-specific antigen. *Clin Biochem* 1999;32:627-34.
129. Oberpenning F, Weining C, Brandt B, De AG, Heinecke A, Hamm M et al. A new modification of the Chiron ACS assay for total prostate-specific antigen achieves equimolar response characteristics and improves the detection of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:90-4.
130. Sturgeon CM, Ellis AR. Improving the comparability of immunoassays for prostate-specific antigen (PSA): progress and problems. *Clin Chim Acta* 2007;381:85-92.
131. Dittadi R, Franceschini R, Fortunato A, Zancan M, Barichello M, Tasca A et al. Interchangeability and diagnostic accuracy of two assays for total and free prostate-specific antigen: two not always related items. *Int J Biol Markers* 2007;22:154-8.
132. Roddam AW, Rimmer J, Nickerson C, Ward AM. Prostate-specific antigen: bias and molarity of commercial assays for PSA in use in England. *Ann Clin Biochem* 2006;43:35-48.
133. Slev PR, La'ulu SL, Roberts WL. Intermethod differences in results for total PSA, free PSA, and percentage of free PSA. *Am J Clin Pathol* 2008;129:952-8.
134. Kort SA, Martens F, Vanpoucke H, van Duijnhoven HL, Blankenstein MA. Comparison of 6 automated assays for total and free prostate-specific antigen with special reference to their reactivity toward the WHO 96/670 reference preparation. *Clin Chem* 2006;52:1568-74.
135. Catalona WJ, Hudson MA, Scardino PT, Richie JP, Ahmann FR, Flanigan RC et al. Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol* 1994;152:2037-42.
136. Carter HB, Pearson JD. PSA velocity for the diagnosis of early prostate cancer. A new concept. *Urol Clin North Am* 1993;20:665-70.
137. Stamey TA, Teplow DB, Graves HC. Identity of PSA purified from seminal fluid by different methods: comparison by amino acid analysis and assigned extinction coefficients. *Prostate* 1995;27:198-203.
138. Semjonow A, Oberpenning F, Brandt B, Zechel C, Brandau W, Hertle L. Impact of free prostate-specific antigen on discordant measurement results of assays for total prostate-specific antigen. *Urology* 1996;48:10-5.
139. Stephan C, Semjonow A. Accuracy assessment of PSA methods must be based on clinical instead of artificial samples--a response to AW Roddam et al., *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 35-48. *Ann Clin Biochem* 2006;43:421-2.

140. Vignati G, Giovanelli L. Standardization of PSA measures: a reappraisal and an experience with WHO calibration of Beckman Coulter Access Hybritech total and free PSA. *Int J Biol Markers* 2007;22:295-301.
141. Blijenberg BG, Yurdakul G, Van Zelst BD, Bangma CH, Wildhagen MF, Schroder FH. Discordant performance of assays for free and total prostate-specific antigen in relation to the early detection of prostate cancer. *BJU Int* 2001;88:545-50.
142. Link RE, Shariat SF, Nguyen CV, Farr A, Weinberg AD, Morton RA et al. Variation in prostate specific antigen results from 2 different assay platforms: clinical impact on 2304 patients undergoing prostate cancer screening. *J Urol* 2004;171:2234-8.
143. Jansen FH, Roobol M, Bangma CH, van Schaik RH. Clinical impact of new prostate-specific antigen WHO standardization on biopsy rates and cancer detection. *Clin Chem* 2008;54:1999-2006.
144. Scaramuzzino DA, Schulte K, Mack BN, Soriano TF, Fritsche HA. Five-year stability study of free and total prostate-specific antigen concentrations in serum specimens collected and stored at -70 degrees C or less. *Int J Biol Markers* 2007;22:206-13.
145. Stephan C. Prostate cancer: WHO standardization of PSA tests: clinical consequences. *Nat Rev Urol* 2009;6:303-5.

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Carsten Stephan, für die Überlassung des Themas und das Vertrauen, das er damit in mich gesetzt hat, sowie für seine engagierte Betreuung der Arbeit. Er stand mir während der gesamten Periode der Fertigstellung dieser Dissertation als Ratgeber zur Seite. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Jung danken, meinem ersten Betreuer und ehemaligem Leiter der urologischen Forschung.

Als nächstes möchte ich mich bei Frau Silke Klotzek für die Beratung in statistischen Fragen bedanken.

Zuletzt, jedoch am meisten, danke ich meinen Eltern, ohne die nichts von alledem möglich gewesen wäre.

Berlin, den 3. Februar 2010

Anna-Maria Kahrs

Lebenslauf

aus datenschutztechnischen Gründen fehlt an dieser Stelle der Lebenslauf

Berlin, den 3. Februar 2010

Anna-Maria Kahrs

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Arbeiten publiziert:

1. Stephan C, Kahrs A-M, Miller K, Deger S, Lein M, Jung K. Comparison of the "gold" standard Access[®] PSA (Hybritech) assay with the new Beckman Coulter WHO-standardized calibrated Access[®] PSA assays [Abstract 276; Eur Urol Suppl 2008;7(3):139]. 23rd Annual Congress of the European Association of Urology, Milan, March 26-29, 2008.
2. Stephan C, Kahrs A-M, Lein M, Jung K, Miller K. -2proPSA als Marker zur verbesserten Beurteilung von aggressiven Prostatakarzinomen. 2. Nordkongress Urologie, Berlin, 5.-7.6.2008.
3. Stephan C, Kahrs A-M, Lein M, Deger S, Jung K, Miller K. Toward metrological traceability in the determination of prostate-specific antigen: Calibrating Beckman Coulter Hybritech Access PSA assays to WHO standards compared with the traditional Hybritech standards. 60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Stuttgart, 24.-27.9.2008.
4. Stephan C, Kahrs A-M, Cammann H, Lein M, Deger S, Jung K, Miller K. [-2]pro PSA significantly improves prostate cancer detection. 60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Stuttgart, 24.-27.9.2008.
5. Stephan C, Kahrs A-M, Cammann H, Miller K, Lein M. [-2]pro PSA significantly improves prostate cancer detection. ISOBM 2008, 36. Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine; Tokyo, Japan, October 5-9, 2008.
6. Stephan C, Kahrs AM, Klotzek S, Reiche J, Muller C, Lein M, et al. Toward metrological traceability in the determination of prostate-specific antigen (PSA): calibrating Beckman Coulter Hybritech Access PSA assays to WHO standards compared with the traditional Hybritech standards. Clin Chem Lab Med 2008;46:623-9.
7. Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, Lein M, Schrader M, Deger S, et al. A [-2]proPSA-based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases. Prostate 2009; Feb 1, 69 (2):198-207.
8. Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, Deger S, Schrader M, Lein M, Jung K, Miller K. An automated assay for -2proPSA significantly improves prostate cancer (PCa) detection in artificial neural network or logistic regression models and enhances differentiation of aggressive PCa [Abstract 296; Eur.Urol Suppl 2009; 8(4): 194]. 24rd Annual Congress of the European Association of Urology, Stockholm, March 17-21, 2009.
9. Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, Deger S, Schrader M, Lein M, Jung K, Miller K. An automated assay for -2proPSA significantly improves prostate cancer (PCa) detection in artificial neural network or logistic regression models and enhances differentiation of aggressive PCa [Abstract; J Urol Suppl 2009;181 (4) S. 816] Annual Congress of the American Urological Association, Chicago, April 25-30, 2009.

Eidstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

“Die -2proPSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik und PSA-Methodenvergleich nach Kalibrierung mit unterschiedlichen Referenzmaterialien“

in der Klinik für Urologie der medizinischen Fakultät der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. Klaus Jung sowie Herrn PD Dr. med. Carsten Stephan ohne sonstige Hilfe erstellt habe. Bei der Abfassung der Dissertation habe ich keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt, die verwendete Literatur wurde vollständig aufgeführt. Die vorliegende Dissertation beruht auf den Ergebnissen eigenständiger wissenschaftlicher Arbeit und stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Ich habe an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt.

Berlin, den 3. Februar 2010

Anna-Maria Kahrs