

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

DISSERTATION

Subformen des freien prostataspezifischen Antigens  
als diskriminatorische Biomarker zwischen  
benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom:  
Etablierung der Analytik mittels  
2-Dimensionaler Elektrophorese  
und erste klinische Ergebnisse

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Axel Böhme

aus Potsdam

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Jung

2. Prof. Dr. med. R. M. Kuntz

3. Doz. Dr. sc.med. G. Brien

**Datum der Promotion: 23.09.2007**

Teile dieser Dissertationsschrift wurden in folgenden Arbeiten publiziert:

1. Jung K, Reiche J, Boehme A, Stephan C, Loening SA, Schnorr D, Hoesel W, Sinha P. Analysis of subforms of free prostate-specific antigen in serum by two-dimensional gel electrophoresis: potential to improve diagnosis of prostate cancer. Clin Chem. 2004;50:2292-301 [1].
2. Poland J, Bohme A, Schubert K, Sinha P. Revisiting electroblotting of immobilized pH gradient gels: a new protocol for studying post-translational modification of proteins. Electrophoresis. 2002;23:4067-71.

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Chemikalien / Geräte.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1    Allgemeine Einführung und Zielstellung der Arbeit.....	1
1.2    Theoretischer Teil.....	3
1.2.1    Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	3
1.2.1.1    Geschichte des PSA.....	5
1.2.1.2    Struktur und Biochemie des PSA.....	5
1.2.1.3    Problematik des PSA.....	6
1.2.1.4    Altersspezifische PSA Referenzbereiche.....	6
1.2.1.5    PSA-Dichte (PSAD).....	7
1.2.1.6    PSA-Anstiegsgeschwindigkeit.....	8
1.2.1.7    Molekulare Formen des PSA.....	8
1.2.2    Proteomics.....	11
1.2.2.1    Hochauflösende 2-Dimensionale Gelelektrophorese.....	12
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1    Patienten und Untersuchungsmaterial.....	13
2.2    Analytische Methoden.....	14
2.2.1    Immunsorption.....	14
2.2.2    Durchführung der 2-Dimensionalen Elektrophorese.....	16
2.2.2.1    Durchführung der 1.Dimension:	
Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten.....	16
2.2.2.2    Durchführung der 2.Dimension:	
SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	18
2.2.3    Western-Blot-Technik.....	19
2.2.4    Immunfärbung.....	20
2.2.5    Auswertung.....	21

---

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1 Optimierung der Methode	22
3.1.1 Nativseren als Probe für die Detektion von fPSA-Subformen	22
3.1.2 Aufbereitung der Serumproben für die 2D-Elektrophorese	24
3.1.2.1 Aufreinigung mit Cibacron Blue Agarose	24
3.1.2.2 Aufreinigung mittels direkter Immunsorption	26
3.1.3 2-Dimensionale Elektrophorese	30
3.1.3.1 Isoelektrische Fokussierung als 1. Dimension	30
3.1.3.2 SDS-PAGE als 2. Dimension	37
3.1.4 Optimierung der Immundetektion	39
3.1.4.1 Wahl des Primärantikörpers	40
3.1.4.2 Optimierung des Primär- und Sekundärantikörpertiters	42
3.1.4.3 Wahl des Detektionssystems	45
3.1.5 Bewertung der Methode	46
3.2 Erste Untersuchungsergebnisse zur klinischen Validität der Trennung von fPSA-Subformen	48
3.2.1 Charakterisierung der untersuchten Patienten hinsichtlich PSA und Tumorklassifikation	48
3.2.2 Qualitative Daten der fPSA-Subformen	49
3.2.3 Quantitative Daten der fPSA-Subformen	50
3.2.4 Verhältnis zu pathologischen Daten	52
3.2.5 Diagnostische Relevanz	52
<b>4 Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1 Diskussion der Methodik	57
4.2 Diskussion der klinischen Ergebnisse	61
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität des PCa in Deutschland 1970–2002 (Fälle pro 100.000).....	2
Abbildung 2	Aufbau der Blotapparatur beim Semidry-Blot-Verfahren.....	20
Abbildung 3	2D-Elektrophorese und Silberfärbung einer Serumprobe.....	22
Abbildung 4	2D-Elektrophorese und Immundetektion einer Seminalplasma-Verdünnungsreihe.....	23
Abbildung 5	2D-Elektrophorese und Silberfärbung einer mit Cibacron Blue aufbereiteten Serumprobe.....	25
Abbildung 6	Detektion von fPSA-Subformen bei Einsatz unterschiedlicher Probenvolumina für die Immunsorption.....	28
Abbildung 7	2D-Elektrophorese einer Serumprobe, IPG-Streifen mit verschiedenen pH-Gradienten.....	31
Abbildung 8	2D-Elektrophorese einer Serumprobe (5 µg Gesamtprotein) unter den Bedingungen unterschiedlicher Probenapplikationen in IPG-Streifen.....	33
Abbildung 9	Ermittlung des maximalen Aufnahmevolumens von 12 cm IPG-Streifen.....	34
Abbildung 10	2D-Elektrophorese einer Serumprobe (5 µg Gesamtprotein) in a) 200 µl bzw. b) 400 µl Rehydratisierungspuffer.....	35
Abbildung 11	2D-Elektrophorese und Immunoblot einer Seminalplasmprobe (2,14 ng tPSA) mit verschiedenen Rehydratisierungspuffern.....	36
Abbildung 12	Parabolisches Verhältnis von Vernetzerkonzentration (C) und Porengröße.....	37
Abbildung 13	2D-Elektrophorese und Silberfärbung von Serumproben (Gesamtprotein 50 µg) mit Gelen verschiedener Vernetzerkonzentrationen in der 2. Dimension.....	38
Abbildung 14	Schema der Reaktionskette bei der Immundetektion.....	39
Abbildung 15	Immunoblot von Seminalplasmproben mit verschiedenen Primärantikörpern.....	40
Abbildung 16	Immunoblot von Serumproben mit verschiedenen Primärantikörpern.....	41

---

Abbildung 17	2D-Elektrophorese und Immunoblot von Seminalplasmaproben (0,38 ng fPSA) bei unterschiedlichen Verdünnungen des Primärantikörpers.....	43
Abbildung 18	2D-Elektrophorese und Immunoblot von Seminalplasmaproben (0,38 ng fPSA) bei unterschiedlichen Verdünnungen des Sekundärantikörpers.....	44
Abbildung 19	2D-Elektrophorese und Immunoblot von Seminalplasmaproben (0,38 ng fPSA) mit verschiedenen Detektionssystemen.....	45
Abbildung 20	Immunsorption, 2D-Elektrophorese und Immundetektion einer Serumverdünnungsreihe (je 1ml-Proben).....	46
Abbildung 21	Sensitivität und Linearität der optimierten Methode (Immunsorption, 2D-Elektrophorese und Immunoblot) zur Detektion von fPSA-Subformen.....	47
Abbildung 22	Verteilungsmuster von a) tPSA, b) fPSA und %fPSA (c) innerhalb der Gruppe von BPH- und PCa-Patienten.....	48
Abbildung 23	Zusammenfassung und Bezeichnung aller gefundenen PSA Fraktionen.....	49
Abbildung 24	fPSA-Subformen a) F1, b) F2, c) F3, d) F4, f) J und e) Quotient aus F2 und F3 in BPH- und PCa-Patientenseren.....	51
Abbildung 25	ROC-Kurven für tPSA, %fPSA und Derivate der fPSA-Subformen.....	53

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Inzidenz und Mortalität des PCa nach Altersgruppen in Deutschland 2002.....	1
Tabelle 2	Komplikationen nach TRUS-geführter Prostatastanziopsie.....	4
Tabelle 3	Altersspezifische Referenzbereiche für PSA-Konzentration im Serum, Prostatavolumen und PSA-Dichte.....	7
Tabelle 4	Gesamtprotein- und Albuminkonzentration in 4 Serumproben vor und nach der Aufreinigung mit Cibacron Blue Agarose.....	25
Tabelle 5	PSA-Konzentrationen der für die Untersuchung des Adsorptionspotenzials von Magnet- und Sepharosebeads verwendeten Proben.....	26
Tabelle 6	Ergebnisse der Immunsorption durch Magnetbeads und Sepharosebeads.....	27
Tabelle 7	Auswirkung der Immunsorption auf das Verhältnis von fPSA zu tPSA (%fPSA).....	28
Tabelle 8	Ermittlung des maximalen Aufnahmevolument von 12-cm- IPG-Streifen.....	34
Tabelle 9	Übersicht über das Auftreten der verschiedenen fPSA-Subformen in Seren der untersuchten 50 BPH- und 50 PCa-Patienten.....	50
Tabelle 10	Flächen unter den ROC-Kurven der fPSA-Subformen und ihre Quotienten im Vergleich zu denen von tPSA und %fPSA in einem Bereich von tPSA von 2 bis 20 µg/l.....	54
Tabelle 11	Diagnostische Sensitivität und Spezifität von tPSA, %fPSA und den Quotienten der fPSA-Subformen F2 und F3 bei 90 % Sensitivität bzw. Spezifität.....	55



---

## Chemikalien und Geräte

### Chemikalien

Acrylamid  
Agarose  
anti-fPSA M30-IgG  
anti-tPSA M36-IgG  
anti-fPSA M30-IgG, biotinylierte  
anti-tPSA M36-IgG, biotinylierte  
anti-tPSA 13C9E9D6G8 (Maus)  
anti-PSA (rabbit) Nr. A056201  
anti-rabbit IgG (goat) Nr. P0448  
APS (Ammoniumpersulfat)  
Bisacrylamid  
BSA (bovines Serumalbumin)  
Bromphenolblau  
Casein  
  
CHAPS  
(3 [(3 cholamidopropyl)dimethylammonio]-  
1-propansulfonat )  
DTT (Dithiothreitol)  
ECL Plus  
Glycin  
Glycerin  
Harnstoff  
Immobiline  
Iodacetamid  
IPG-Puffer  
KBr  
Natriumazid  
Natriumthiosulfat  
Magnetbeads, Streptavidin-gekoppelt  
Sephrosebeads  
(PSM 773 Affinity Resin)  
Fast Flow Cibacron Blue 3GA  
SDS (Natriumdodecylsulfat)

### Hersteller

Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland  
Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland  
Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland  
Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland  
BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich  
Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland  
Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland  
Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA  
Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Amersham-Pharmacia, Stockholm, Schweden  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Amersham-Pharmacia, Stockholm, Schweden  
Merck, Darmstadt, Deutschland  
Amersham-Pharmacia, Stockholm, Schweden  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Merck, Darmstadt, Deutschland  
Merck, Darmstadt, Deutschland  
Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland  
Hybritech, San Diego, CA, USA  
Sigma, St.Louis, MO, USA  
Merck, Darmstadt, Deutschland

---

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan )	Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA
Thioharnstoff	Sigma, St.Louis, MO, USA
Tris	Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA
Tris-MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure in Hydroxymethyl aminomethan )	Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA
Triton-X	Sigma, St.Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma, St.Louis, MO, USA

### **Geräte**

Büretten, computergesteuert  
 Dry Strip Holder  
 Elecsys 2010  
 Fluor-S Multilmager  
 GelBond-Folie  
 Gelkassette  
 GraphPad Prism 4.01 für Windows  
 Glasplatten  
 Immulite 2000  
 IPGphor  
 MedCalc 7.4.2.0  
 Multiphor II  
 PDQuest-Software  
 PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer-Membran mit 0,45 µm Porengröße)  
 Semiphor  
 SPSS 12.01 für Windows  
 XCELL II MiniCell

### **Hersteller**

Desaga, Heidelberg, Deutschland  
 Amersham-Pharmacia, Stockholm, Schweden  
 Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland  
 Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA  
 Amersham-Pharmacia, Stockholm, Schweden  
 Novex/Invitrogen Carlsbad, CA, USA  
 GraphPad Software  
 Fensterglas zugeschnitten  
 Diagnostic Products Corp., Los Angeles, USA  
 Amersham-Pharmacia, Stockholm, Schweden  
 MedCalc Software, Mariakerke, Belgien  
 Amersham-Pharmacia, Stockholm, Schweden  
 Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA  
 Millipore, Bedford, MA, USA  
 Hoefer, CA, USA  
 SPSS Inc., Chicago, IL, USA  
 Novex/Invitrogen Carlsbad, CA, USA

---

## Abkürzungsverzeichnis

%fPSA	Quotient freies PSA zu Gesamt-PSA
2D-Elektrophorese	Zweidimensionale Elektrophorese
ACT	$\alpha_1$ -Antichymotrypsin
ACT-PSA	$\alpha_1$ -Antichymotrypsin gebundenes PSA
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Area under the curve
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BPSA	BPH-assoziiertes PSA
BSA	Rinder- (bovines) Serumalbumin
C	Vernetzungsgrad / Kohlenstoff
CCD	Charge-coupled Device
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
cPSA	komplexiertes PSA
DRU	digitale rektale Untersuchung
DTT	Dithiothreitol
fPSA	freies prostataspezifisches Antigen
hK	humanes Kallikrein
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
KBr	Kaliumbromid
kDa	Kilodalton
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie
lwPSA	low weight PSA (fPSA-Subformen mit Molekulargewicht von < 32 kDa)
Lys	Lysin
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Isotonische NaCl-Lösung in Phosphatpuffer
PCa	Prostatakarzinom
pI	isoelektrische Punkten
PIN	intraepitheliale Neoplasie der Prostata
pK	negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante eines Elektrolyten
POD	Peroxidase

---

proPSA	Vorläufer-PSA
PSA	prostata-spezifisches Antigen
PSAD	PSA-Dichte
PSA-ÜZ	PSA-Dichte der Übergangszone
PVDF	Polyvinylidendifluorid
P-Wert	Signifikanzwert
ROC	Receiver-operation-characteristics
$r_s$	Korrelationskoeffizient nach Spearman
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
swPSA	standard wight PSA (fPSA-Subformen mit Molekulargewicht von ca. 32 kDa)
T	Totalacrylamidkonzentration
TBS	Tris-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
tPSA	Gesamt-PSA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRUS	transrektaler Ultraschall
TVP	transvesikale Prostatektomie

## 1 Einleitung

### 1.1 Allgemeine Einführung und Zielstellung der Arbeit

Das Prostatakarzinom (PCa) ist mit 22,3 % der geschätzten Krebsneuerkrankungen die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes in Deutschland, gefolgt von malignen Darmtumoren (16,3 %) und Lungentumoren (14,9 %) [2]. Jährlich erkranken etwa 48.650 Patienten an einem PCa. Damit besteht eine Inzidenz von 98,5 pro 100.000 männliche Einwohner. Die Mortalität betreffend, steht das Prostatakarzinom mit 10,4 % der zum Tode führenden Krebserkrankungen an dritter Stelle hinter Malignomen der Lunge (26,3 %) und des Darmes (12,8 %). Die Mortalität per definitionem liegt bei 24,3 pro 100.000 Einwohner. In der Tabelle 1 findet sich eine aktuelle Aufstellung von Inzidenz und Mortalität des PCa in Deutschland für verschiedene Altersgruppen und in standardisierter Rate (insgesamt altersunabhängig).

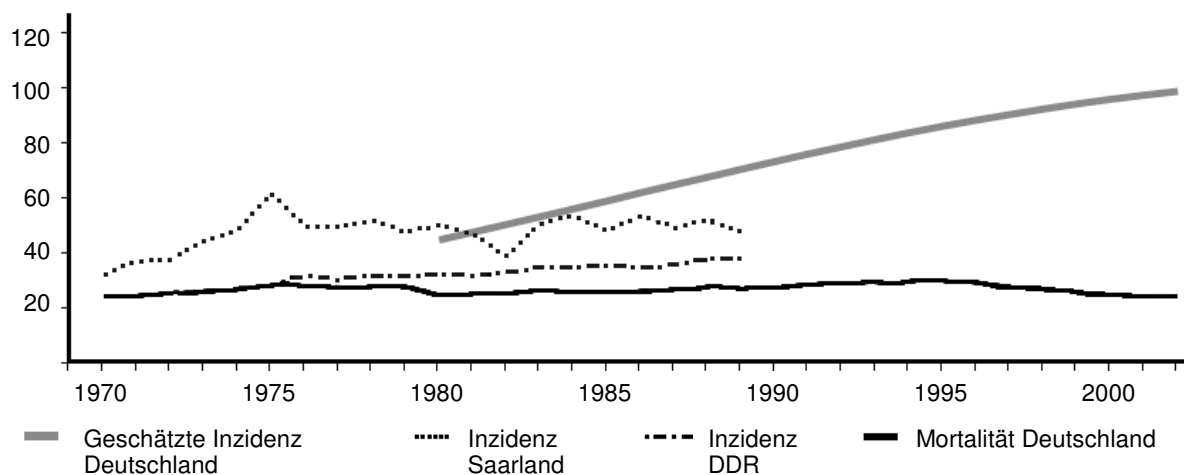
**Tabelle 1**  
**Inzidenz und Mortalität des PCa nach Altersgruppen in Deutschland 2002**  
 Fälle pro 100.000 Männer (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Robert Koch Institut 2006 [2])

Alter in Jahren	Inzidenz	Mortalität
	Fälle pro 100.000	Fälle pro 100.000
Unter 45	0,0	0,0
45 bis unter 60	65,8	5,2
60 bis unter 75	429,9	62,0
75 und älter	809,6	366,1
Standardisierte Rate <sup>a</sup>	98,0	24,3

<sup>a</sup> Insgesamt altersunabhängige Rate

Im Rahmen von Obduktionen lassen sich bei zunehmendem Alter vermehrt zuvor unbekannte PCa (inzidentielle PCa) entdecken. So liegt etwa bei 10 % der 50-Jährigen und etwa bei 70 % der 80-Jährigen ein inzidentielles PCa vor [3]. In einer anderen Untersuchung fanden sich sogar bei 34 % der 50-Jährigen ein Karzinom [4].

Wie in Abbildung 1 veranschaulicht wird, ist seit Einführung der Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) in die Früherkennungsdiagnostik des PCa Ende der 80er-Jahre ein steiler Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen. Die Mortalität ist bei einem leichten Anstieg bis Mitte der 90er-Jahre inzwischen wieder auf das Niveau von 1970 zurückgefallen.



**Abbildung 1**  
**Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität des PCa in Deutschland 1970–2002 (Fälle pro 100.000)** (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Robert Koch Institut, 2006 [2])

Angesichts dieser Zahlen und des Umstandes, dass eine kurative Behandlung meist nur im Stadium T1 und T2 (Begrenzung des Tumors auf die Prostata) möglich ist, ist die Entwicklung optimaler Methoden zur Früherkennung des PCa erforderlich.

Der aktuelle Diagnostikstandard mit digital rektaler Prostatauntersuchung, transrektaler Prostatasonographie sowie Bestimmung des Serum-PSA weist nur eine begrenzte diagnostische Sensitivität und Spezifität auf. Vor allem im Bereich niedriger PSA-Werte (4 - 10 µg/l Gesamt-PSA) ist nur eine ungenügend sichere Differenzierung zwischen dem PCa und benignen Prostataerkrankungen, insbesondere der benignen Prostatahyperplasie (BPH) möglich. Eine abschließende Diagnose kann nur anhand der histologischen Untersuchung einer bioptisch gewonnenen Gewebeprobe erfolgen. Da aber gutartige Prostataerkrankungen auch PSA-Werte in diesem Bereich aufweisen, wird bei 60 - 80 % aller durchgeführten Prostatabiopsien kein Karzinom nachgewiesen. Daraus ergibt sich eine hohe Anzahl unnötiger Biopsien. Die Erarbeitung besserer Indikationsstellungen zu Prostatabiopsie ist somit eine vordringliche Aufgabe der Forschung. Die Bestimmung der molekularen Formen des PSA und die Nutzung des Quotienten freies PSA zu Gesamt-PSA (%fPSA) hat die Situation zwar deutlich verbessert, aber die Ergebnisse sind trotzdem nicht zufrieden stellend. Da auch das freie PSA (fPSA) selbst eine heterogene Fraktion darstellt, wurde angenommen, dass durch

eine weitere Differenzierung des fPSA in seine Subformen eine diagnostische Verbesserung möglich ist [5]

Mit der vorliegenden Dissertationsarbeit habe ich mir zum Ziel gesetzt, eine Analytik mittels 2-Dimensionaler Elektrophorese zu entwickeln, um damit Subformen des freien PSA zur effektiveren Differenzierung von BPH und PCa detektieren zu können. In einem zweiten Teil der Arbeit werde ich erste Ergebnisse zu deren diagnostischer Validität dokumentieren und daraus entsprechende Schlussfolgerungen ziehen.

Im Folgenden werde ich im theoretischen Teil meiner Arbeit den gegenwärtigen Stand der Prostatakarzinomdiagnostik näher ausführen. Ich werde damit die Notwendigkeit begründen, weitere Forschungsarbeiten, wie sie in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, durchzuführen, um die Diagnostik des Prostatakarzinoms zu verbessern.

## **1.2 Theoretischer Teil**

### **1.2.1 Diagnostik des Prostatakarzinoms**

Seit 1971 besteht in Deutschland eine gesetzlich verankerte Vorsorgeuntersuchung, die jedoch nur etwa 14 % aller Männer wahrnehmen [6]. Die Vorsorgeuntersuchung bezieht sich aber lediglich auf die digitale rektale Untersuchung (DRU). Durch die bei der DRU vorgenommene Beurteilung der Prostatagröße, deren Oberflächenstruktur und Abgrenzbarkeit gegenüber umliegenden Gewebes können schon 16 – 51 % der Karzinome entdeckt werden [7]. Seltener Karzinome der Transitionalzone können hiermit nicht erkannt werden. Zudem ist der genannte positiv prädiktive Wert abhängig von der Erfahrung des Untersuchers. Die DRU galt bis zur Einführung des PSA als wichtigste Untersuchung zur Erkennung des PCa. Zum PSA werde ich in einem separaten Kapitel (1.2.1.1) Stellung beziehen.

Ergänzend zur DRU kann eine transrektale Sonographie (TRUS) durchgeführt werden. Mit Hilfe eines 7,5-MHz-Schallkopfes kann die gesamte Prostata im Längs- wie auch im Querschnitt inklusive der Samenblasen detailliert dargestellt werden. Auch hier ist jedoch die Befundung abhängig von der Erfahrung des Untersuchers. So differiert der positiv prädiktive Wert zwischen 29,5 und 56,3 % [8-10]. Weitere bildgebende Verfahren wie Tomographie und Szintigraphie sind darüber hinaus möglich, dienen jedoch eher der Stadieneinteilung (Staging) eines bereits bekannten PCa als der Primärtumorsuche.

Bei Verdacht auf das Vorliegen eines PCa wird eine transrektal sonographisch gesteuerte Biopsie durchgeführt. Sie wurde erstmalig 1989 als Sextantenbiopsie beschrieben [11]. Heute werden in der Regel jedoch umfangreichere Biopsien (Oktantenbiopsie oder mehr) durchgeführt. Hierbei kann über eine am Schallkopf befestigte Zielvorrichtung eine gezielte Prostatastanzbiopsie, üblicherweise aus der peripheren Zone im Apexbereich, Seitenlappen, Basisbereich und gegebenenfalls aus suspekten Bereichen gewonnen werden.

Auch wenn die Biopsieentnahme ambulant und ohne Anästhesie durchführbar ist, können doch Komplikationen auftreten. Der Arzt ist verpflichtet, den Patienten darüber aufzuklären.

**Tabelle 2**

**Komplikationen nach TRUS-geführter Prostatastanzbiopsie (16-G-Nadel);**  
 ≥ 6 Stenzen (n=89 Patienten) [12]

Komplikation	Häufigkeit (%)
Hämaturie	58
Blut im Stuhl	37
Hämatospermie	28
Darmprobleme	14
Obstruierte Miktion	7
Nausea bzw. Erbrechen	4
Fieber	4
Epididymitis	1

Die Einführung des prostataspezifischen Antigens (PSA) als Tumormarker für das PCa führte zu einer deutlichen Verbesserung der Früherkennung. Über 20 Jahre nach der Entdeckung des PSA hat es sich als bester Marker zur Früherkennung, zur Einteilung der Tumorstadien und Therapieüberwachung bei einem PCa etabliert [13]. Die PSA-Messung übertrifft für sich gesehen bereits die Vorhersagekraft der rektalen digitalen Untersuchung. Die Kombination aus beiden stellt bis dato die effektivste Methode zur Entdeckung eines PCa dar [14-18]. So konnte seit der Verwendung des PSA zur Früherkennung eine deutliche Tumorstadienverschiebung hin zu niedrigeren, das heißt mehrheitlich zu organbegrenzten Tumoren festgestellt werden [19-21]. Ob es letztlich auch die Mortalitätsrate zu senken vermag, wird derzeit in verschiedenen großen Studien (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer ERSPC und Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial PLCO) untersucht [22].



### 1.2.1.1 Geschichte des PSA

Bereits 1971 fanden Hara et al. [23] ein  $\gamma$ -Seminoprotein in Seminalplasma. Li und Beling [24] identifizierten 1973 das gleiche Protein, nannten es aber aufgrund seiner elektrophoretischen Beweglichkeit Protein E1. Sensabaugh [25] charakterisierte das Protein weiter nach dessen molekularem Gewicht (30 kDa) und nannte es entsprechend p30. Wang et al. [26] berichteten 1979 von einem Antigen, gewonnen aus einem Pool von normalen, hypertrophen und malignen Prostatagewebearealen. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass es offenbar organspezifisch, das heißt nicht in Knochen, Interstitium, Milz, Leber, Niere nachweisbar war. Später ließ sich PSA in Spuren im Endometrium [27], im Pankreas, den Speicheldrüsen [28], im Gewebe der Mamma [29,30], den periurethralen und perianalen Drüsen [31-33] nachweisen. Papsidero et al. [34] fanden das Protein schließlich auch im Serum. Durch den Fortschritt in der Aminosäuresequenzierung ist heute bekannt, dass alle genannten Proteine ein und dasselbe Molekül sind – das PSA [35-37].

Kuriyama [38] entwickelte 1980 ein „enzyme-linked immunosorbant assay“ (ELISA) und erbrachte damit den Nachweis von Serum-PSA ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/l}$ . Im Weiteren konnte bewiesen werden, dass vor allem die BPH und das PCa zu einem signifikanten PSA-Anstieg im Serum führen. Weitere Studien konnten den Stellenwert der PSA-Messung zur Früherkennung des PCa bestätigen [39-42].

### 1.2.1.2 Struktur und Biochemie des PSA

Das reife, enzymatisch aktive PSA ist ein einkettiges Glykoprotein mit 237 Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt 33 kDa. Als Serinprotease gehört das PSA zur Familie der humanen glandulären Kallikreine (hK) und wird in diesem Zusammenhang auch als hK3 bezeichnet. Alle Proteine dieser Familie sind in Genen codiert, die auf dem Chromosom 19q13.3-13.4 lokalisiert sind [43]. Doch nur hK2 und PSA (hK3) sind prostataspezifisch. Sie weisen darüber hinaus eine 78 %ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz auf [44].

Die Synthese des PSA wird von Testosteron bzw. von Dihydrotestosteron gesteuert. Diese wirken unmittelbar über Androgenrezeptoren auf das Prostataepithel. Daher führt ein Mangel an Testosteron zur Apoptose dieser Zellen [32], was heutzutage auch therapeutisch genutzt wird.

Im Wesentlichen wird PSA von den Epithelzellen der Azini und Drüsenzellen der Prostata synthetisiert. Man geht davon aus, dass es im rauhen endoplasmatischen Retikulum gebildet,

in Vakuolen gespeichert und durch Exozytose in das Seminalplasma abgegeben wird [26]. Es dient der Verflüssigung des Seminalplasmas bei der Ejakulation. Dabei wirkt es proteolytisch auf die Proteine Semenogelin I und II sowie auf Fibronektin, die aus der Samenblase stammen und die Hauptfaktoren für die Bewegungseinschränkung der Spermien sind [45].

Im Seminalplasma liegt es in einer Konzentration von 0,5-3 g/l vor. Im Serum liegt die Konzentration mit 0 – 6,5 µg/l um den Faktor  $10^6$  niedriger.

### 1.2.1.3 Problematik des PSA

Als obere Referenzgrenze wird in der Urologie eine Gesamt-PSA-Konzentration von  $\leq 4,0$  µg/l angesehen. Da das PSA weitgehend organspezifisch, aber nicht karzinomspezifisch ist, liegt bei höheren Werten nicht zwangsläufig ein PCa vor bzw. schließen Werte im Normbereich ein PCa nicht aus. So kann, wie bereits eingangs betont, bei erhöhten PSA-Werten ebenso eine benigne Prostatahyperplasie, eine intraepitheliale Neoplasie der Prostata (PIN), eine Prostataischämie oder gar ein Prostatainfarkt oder eine akute bzw. chronische Prostatitis vorliegen [46]. Auch mechanische Manipulationen können kurzzeitig zu einem PSA-Anstieg beitragen. So ist die digital rektale Untersuchung an sich unbedenklich [47], eine vorgenommene Prostatamassage kann je nach Durchführung zu einer Verdopplung des PSA-Wertes führen [48]. Transrektale Ultraschalluntersuchungen, Prostatastanzbiopsien [49], aber auch Ejakulation [50] und sogar Fahrradfahren können ebenfalls zu einem PSA-Anstieg führen.

So zeigte sich bereits zu Beginn des Einsatzes von PSA zur Frühdiagnostik aufgrund seiner Organspezifität aber mangelnder PCa-Spezifität das Defizit im Bereich niedrigerer PSA-Werte. Bei Werten unter 10 µg/l lässt sich PSA zunehmend schlechter zur Differenzierung zwischen BPH und PCa heranziehen [15,51-53]. So beschreiben beispielsweise Beduschi et al. [54] 65 % falsch-positive PCa Befunde. Daher gab es verschiedene im Folgenden ausgeführte Ansätze, die Spezifität der PSA Messung zu verbessern.

### 1.2.1.4 Altersspezifische PSA-Referenzbereiche

Oesterling [55] forderte 1993 die Anpassung der Normwerte des PSA an das Lebensalter, nachdem er eine direkte Korrelation zwischen beiden Parametern festgestellt hatte. So berechnete er einen jährlichen PSA-Anstieg von durchschnittlich 3,2 %. Gleiches entdeckte er die Prostatagröße betreffend. Hier ging er von einer durchschnittlich jährlichen

Größenzunahme von 1,6 % aus. Daraus leitete er altersspezifische Referenzwerte für das PSA und das Prostatavolumen ab, die in Tabelle 3 zusammengestellt sind.

**Tabelle 3**  
**Altersspezifische Referenzbereiche für PSA-Konzentration im Serum, Prostatavolumen und PSA-Dichte [55].**

Parameter	Altersgruppe (Jahre)			
	40-49	50-59	60-69	70-79
Serum-PSA-Konzentration ( $\mu\text{g/l}$ )	0,0-2,5	0,0-3,5	0,0-4,5	0,0-6,5
Prostatavolumen (ml)	13-51	15-60	17-70	20-82
PSA-Dichte ( $\mu\text{g/l} * \text{ml}^{-1}$ )	0,0-0,08	0,0-0,10	0,0-0,11	0,0-0,13

### 1.2.1.5 PSA-Dichte (PSAD)

Stamey [48,56] beschrieb 1987 signifikante Unterschiede des Verhältnisses von Prostatagröße und PSA-Wert bei Patienten mit BPH im Vergleich zum PCa-Patienten. So lässt 1 g BPH-Gewebe die PSA-Konzentration im Serum durchschnittlich um 0,2 – 0,3  $\mu\text{g/l}$  ansteigen. 1 g PCa-Gewebe hingegen lässt die PSA-Konzentration durchschnittlich um 3,5  $\mu\text{g/l}$  ansteigen. Veneziano [56] beziffert die so genannte PSA-Dichte, also das Verhältnis von PSA-Serum-Konzentration und Prostatagröße, bei BPH-Patienten auf 0,09  $\mu\text{g/l/cm}^3$  und bei PCa-Patienten auf 1,7  $\mu\text{g/l/cm}^3$ .

Daraus ergab sich der Ansatz der volumenkorrigierten PSA-Werte. Die PSA-Dichte verbessert die Spezifität der alleinigen PSA-Messung deutlich. Allerdings ist die Prostatagröße, wie beschrieben, allein schon lebensalterabhängig. Darüber hinaus liegen erhebliche Schwankungen bei der transrektal sonographisch ermittelten Prostatagröße sowohl intra- als auch interindividuell vor [57]. So wurden für die PSAD-Obergrenze Werte zwischen 0,15 und 0,25  $\mu\text{g/l} * \text{ml}^{-1}$  angegeben. Zusätzlich unterliegt die Zuverlässigkeit der Volumenmessung erheblichen methodischen Streuungen. Bei kleinen Karzinomen, die in einem großen Prostataadenom wachsen, fällt zudem die PSAD deutlich niedriger aus [58]. In Anbetracht der Tatsache, dass PSA besonders in der Übergangszone der Prostata produziert wird, wurde die PSAD der Übergangszone (PSA-ÜZ) entwickelt. Diese ist gerade bei geringeren PSA-Werten der PSAD überlegen [59]. Doch der grundsätzliche Nachteil durch die schwankende Genauigkeit der sonographischen Volumenmessung besteht auch bei diesem Parameter.

### 1.2.1.6 PSA-Anstiegsgeschwindigkeit

Ausgehend von der vermehrten PSA-Freisetzung aus dem PCa-Gewebe (wie oben beschrieben) und der Beobachtung, dass ein PCa mit einer 2- bis 3-mal schnelleren Größenzunahme der Prostata verbunden ist [60,61], wurde das Konzept der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit entworfen. Nach diesem Konzept wird der absolute jährliche Anstieg des Serum-PSA betrachtet. Ein Anstieg von 0,75 µg/l pro Jahr gilt als malignitätsverdächtig [62,63] und sollte stanziobiologisch validiert werden. Die Anwendung dieses Konzeptes zur Erkennung eines PCa setzt jedoch immer eine Verlaufsbeobachtung und die PSA-Bestimmung mit der gleichen Messmethode voraus. So unterliegt die PSA-Konzentration deutlichen Schwankungen von bis zu 0,8 µg/l [64] in Abhängigkeit der Messmethode. Hinzu kommen intraindividuelle, biologische Schwankungen, die insgesamt Abweichungen von 8,8 % eines PSA-Wertes ergeben können [65]. Schon daraus ergibt sich die eingeschränkte Verwendbarkeit der PSAV, ganz abgesehen von der wachsenden Anstiegsgeschwindigkeit bei zunehmendem Lebensalter.

All diese Versuche, die diagnostische Aussagekraft des PSA zu verbessern, sind, wie beschrieben, letztlich nur wenig zufrieden stellend bzw. konnten die Aussagekraft nicht signifikant steigern. So fanden die molekularen Formen des PSA zunehmend Beachtung. Im folgenden Kapitel möchte ich näher auf diese molekularen Formen des PSA und im Speziellen auf die des freien PSA eingehen.

### 1.2.1.7 Molekulare Formen des PSA

PSA liegt im Serum als freies, nicht gebundenes (fPSA) sowie an Proteaseninhibitoren gebundenes, komplexiertes Molekül (cPSA) vor [66-68]. Die komplexierte Form ist nahezu ausschließlich an  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin gebunden (ACT-PSA) und stellt etwa 70 – 90 % des Gesamt PSA (tPSA) dar. In weitaus geringerem Maß kommen Komplexe mit  $\alpha_1$ -Antitrypsin, Inter- $\alpha$ -Trypsininhibitor, Antithrombin III und Protein C vor [39,69-71]. Isoliert man PSA aus dem ACT-Komplex erhält man sowohl bei PCa- als auch bei BPH-Seren eine gleichermaßen enzymatisch aktive, homogene Form des PSA, die dem aktivem PSA aus dem Seminalplasma zu entsprechen scheint [72].

Ein bisher in der Literatur unterschiedlich angegebener Anteil des Serum-PSA (0-63% [73]) ist an das  $\alpha_2$ -Makroglobulin gebunden. Aufgrund seiner Größe umschließt das  $\alpha_2$ -Makroglobulin

das PSA-Molekül und damit alle freien Epitope, sodass es durch die kommerziellen PSA-Assays nicht erfasst wird [74].

fPSA liegt im Serum zu 10 – 30 % des tPSA vor. Der Anteil von fPSA am tPSA im Serum (im Weiteren in der allgemein gebräuchlichen Form als %fPSA bezeichnet) ist im Falle eines PCa niedriger als im Falle einer BPH [67,68,75-77]. Gegensätzlich verhält sich der Anteil des cPSA bzw. ACT-PSA. Dieser Umstand bot sich als neuer diskriminatorischer Faktor zwischen BPH und PCa an. So konnte inzwischen in zahlreichen Studien die diagnostische Validität des %fPSA im Gegensatz zur alleinigen Messung des tPSA dokumentiert werden [5]. Vor allem im Grauzonenbereich von 4 -10 µg/l tPSA, in dem die alleinige Messung des tPSA schwerlich eine Differenzierung zwischen BPH und PCa zulässt, verbessert die Bestimmung des %fPSA die Spezifität [75-77]. So könnten 19 bis 64 % negativer Stanzbiopsien durch die Bestimmung des %fPSA vermieden werden [5]. Dazu wurden verschiedene Normwerte für %fPSA von 15 - 25 % deklariert.

Trotz der großen Anzahl von Studien, die den Nutzen der %fPSA-Bestimmung untersuchen, ist ein Vergleich der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Normwerte, Studiendesigns und Datenanalysen schwierig. So stellen manche Arbeitsgruppen den zusätzlichen Nutzen durchaus in Frage [78,79].

Bei der Betrachtung des fPSA zeigte sich jedoch bald eine Heterogenität in mehreren Isoformen mit isoelektrischen Punkten (pI) zwischen 6,6 und 7,2 [80,81]. So wurden Subformen mit verschiedenen langen Pro-Peptiden als Erscheinungsformen eines Vorläufer-PSA (proPSA), mit internen Kettenbrüchen der Aminosäuresequenz, darunter eine BPH-assoziierte Form (BPSA), verkürzte PSA-Moleküle, aber auch intakte PSA-Subformen, die durch proteolytische Einflüsse ihre enzymatische Aktivität verloren haben, beschrieben. Im Folgenden möchte ich nun näher auf diese Subformen eingehen.

PSA wird zunächst als präproPSA mit einer zusätzlichen Anfangssequenz von 17 Aminosäuren in den Epithelzellen der Azini und Drüsenzellen der Prostata synthetisiert. Diese Anfangssequenz wird cotranslatorisch auf 7 Aminosäuren verkürzt. Damit entsteht eine enzymatisch inaktive Vorläuferform, das so genannte proPSA mit insgesamt 244 Aminosäuren [82]. In dieser Konfiguration wird das proPSA aktiv durch die die Epithelzellen umgebende Basalmembran in das Drüsenlumen sezerniert. Hier erfolgt die Abspaltung des Pro-Peptids, der letzten 7 N-terminalen Aminosäuren, maßgeblich durch das aktivierte humane Kallikrein 2 (hK2), das ebenfalls in den Epithelzellen der Prostata synthetisiert wird. Hiermit ist die eigentliche enzymatisch aktive Form des PSA entstanden. Diese besteht aus einer Kette von

237 Aminosäuren mit 5 internen Disulfidbrücken und einem Oligosaccharid bei insgesamt einer molekularen Masse von 33 kDa [83-85].

Diffundiert das ausgereifte, aktive PSA in die periphere Blutzirkulation geht es wie schon beschrieben schnell Komplexe mit Proteaseninhibitoren, maßgeblich  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin ein [67,68]. Im PCa-Gewebe erfolgt jedoch eine vermehrte Durchgängigkeit oder gar die Zerstörung der die Epithelzellen umgebenden Basalzellen und Basalmembran sowie eine Auflösung der regelhaften Drüsenstruktur. Dies führt zu einer beschleunigten direkten Abgabe in die Blutzirkulation [86,87].

Das bei unauffälliger Prostata zwischen 10 und 30 % vorkommende freie PSA stellt verschiedene Subtypen proteolytisch inaktiver PSA-Formen dar. An verschiedenen Stationen der PSA-Reifung kann es zu Unterbrechungen oder zusätzlichen Veränderungen kommen. So wurden verkürzte proPSA-Formen beschrieben, die vor allem in PCa-Gewebe vermehrt auftreten [88]. Dabei sind 1 - 6 Aminosäuren des N-terminalen Pro-Peptids (APLILSR) vermutlich durch posttranslatorische Proteolyse entfernt. Entsprechend werden diese Formen als (-2), (-4) oder (-5)proPSA bezeichnet [89,90]. Diese Formen sind enzymatisch inaktiv. Je kürzer das Pro-Peptid ist, desto langsamer und unwahrscheinlicher erfolgt die Aktivierung durch hK2, also die vollständige Abspaltung des Pro-Peptids. (-2)proPSA ist gegenüber einer Aktivierung vollkommen resistent [91]. Dass diese proPSA-Formen bei erhaltener Drüsenstruktur der benignen Prostata länger der Aktivierung durch hK2 ausgesetzt sind als im malignen Prostatagewebe, scheint den größeren Anteil dieser Formen an freiem PSA in PCa-Seren zu bedingen. In untersuchten Seren mit tPSA von 4 - 10  $\mu\text{g/l}$  beträgt der proPSA-Anteil an fPSA im Falle einer benignen Prostata etwa 50 %, im Falle eines PCa etwa 65 %. In PCa-Seren mit tPSA-Werten von 10 - 20  $\mu\text{g/l}$  steigt der Anteil an proPSA auf etwa 75 % bei gleichzeitig weiter abfallendem %fPSA [90]. Damit stellen die proPSA-Formen, vor allem (-2)proPSA einen viel versprechenden Ansatz zur Verbesserung der Spezifität des PSA zur frühen Detektion eines PCa dar [90].

Eine weitere Subform des fPSA ließ sich zunächst nur aus Prostatagewebe isolieren. Vermehrt findet sie sich in der Transitionalzone der benignen hyperplastischen Prostata (daher die Bezeichnung BPSA). Im Mittel liegen hier 11,4 % des fPSA als BPSA vor. Im Gegensatz dazu finden sich in der peripheren Zone der benignen bzw. malignen Prostata aber auch der Transitionalzone der malignen Prostata nur etwa 3,2 – 4,9 % des fPSA als BPSA [92]. BPSA ist eine weitere enzymatisch inaktive PSA-Subform, bestehend aus einer Kette von 237 Aminosäuren, wie das reife aktive PSA, jedoch mit molekülinternen Kettenbrüchen bei Lys 145 und Lys 182 [92]. Nach erfolgter Molekülcharakterisierung konnte BPSA auch im Serum

nachgewiesen werden. So fanden sich in Seren mit einem tPSA von  $< 10\mu\text{g/l}$  etwa 25 % des fPSA als BPSA. Allerdings ist dieser Anteil gleichermaßen in PCa- und BPH-Seren. Einzig in Seren mit unauffälligem tPSA ( $< 4\mu\text{g/l}$ ) ließ sich BPSA nicht nachweisen [93]. Damit scheint Serum-BPSA eher mit dem Prostatavolumen zu korrelieren als mit der Dignität.

Einige weitere Subformen wurden beschrieben, die im Serum nichtkomplexiert werden. Diese Formen gleichen oftmals dem reifen aktivem PSA sind jedoch durch weitere interne Brüche (85/86, 145/146, oder 182/183) inaktiviert [94]. Weiterhin wurden Subformen beschrieben, denen einige Aminosäuren entweder N- oder C-terminalseitig fehlen. Genauere Charakterisierungen, wie auch der Nachweis der klinischen Validität der erwähnten Subformen stehen jedoch noch aus.

Das gesamte Spektrum an Subformen des fPSA lässt sich erst mittels 2-Dimensionaler Elektrophorese und Immunoblotting darstellen [95,96]. Diese Techniken stellen analytische Methoden dar, die einen wesentlichen Bestandteil der Proteomics ausmachen. Zu diesem in der molekularbiologischen Forschung häufig zu findenden Begriff werde ich nachstehend einige kurze Ausführungen machen und damit den theoretischen Teil meiner Arbeit abschließen.

### 1.2.2 Proteomics

Proteomics oder Proteomforschung ist ein neueres Gebiet, das die Genomforschung zu ergänzen versucht. So beschäftigt sich Letztere mit der Entschlüsselung des Genoms, also damit, welche Genloci ein bestimmtes Protein kodieren. Um jedoch die komplexen physiologischen Vorgänge im Organismus verstehen zu können, ist es darüber hinaus nötig, die Proteine in all ihren Erscheinungsformen beziehungsweise das Proteom als Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle vorhandenen Proteine zu beurteilen [97]. Dies hat sich Proteomics zur Aufgabe gemacht. Ausschlaggebend für die Biosynthese eines Proteins ist vor allem die spezifische Fähigkeit des betreffenden Gewebes beziehungsweise der einzelnen Zelle. Darüber hinaus sind jedoch auch äußere Bedingungen wie Temperatur, Interaktion mit anderen Zellen, Stress und Medikamente entscheidend, ob und in welchem Maße synthetisiert wird. Durch posttranslatorische Modifikationen wie Glycolisierung, Phosphorylierung oder Acetylierung kann ein Protein dann weiter verändert werden. Daher stellt das Proteom eine sich stetig wandelnde Konstellation dar, die spezifisch für die augenblickliche Situation des Organismus ist.

Proteomics bietet nun die Möglichkeit, diese Konstellation darzustellen, in Beziehung zu physiologischen Abläufen zu stellen und einzelne Proteine von besonderem Interesse dann zu identifizieren und zu quantifizieren.

Dazu hat sich die Methode der 2-Dimensionalen Gelelektrophorese etabliert, die in der Lage ist, Proteine aus verschiedensten Proben (Zellen, Extrazellulärflüssigkeiten, Geweben, Organismen) hochauflösend zu trennen, darzustellen und zu quantifizieren.

### 1.2.2.1 Hochauflösende 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Die 2-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D PAGE), erstmalig 1975 von O'Farrell [98] beschrieben, trennt Proteine nach zwei Kriterien auf. In der ersten Dimension erfolgt mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) eine Auftrennung entsprechend des Isoelektrischen Punktes (pI). In der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) entsprechend der molekularen Masse der Proteine. Zur Wirkweise dieses Reagenzes werde ich im Kapitel 2.2.2.2 einige Ausführungen machen. Das Verfahren hat eine derzeitige einzigartige Kapazität zur Auftrennung komplexer Proteinmischungen. So können mehrere tausend Proteine gleichzeitig analysiert werden. Durch die anfängliche Benutzung von in Lösung befindlichen Ampholyten (so genannte Trägerampholyten) bei der IEF, bestand ein zeitlich instabiler pH-Gradient. Daraus ergab sich eine ungenügende Reproduzierbarkeit und schlechte Vergleichbarkeit der erhaltenen Muster. Der pH-Gradient wanderte während der Auftrennungszeit Richtung Kathode und flachte zudem in seiner Mitte zunehmend ab. Mit der Einführung immobilisierter pH-Gradienten (IPG) 1982 durch Bjellqvist et al. [99] konnte dieses Problem behoben werden. In diesem Verfahren werden einige wenige definierte Ampholyte (in diesem Zusammenhang Immobiline genannt) bei der Polymerisation der Acrylamidmatrix mit eingebunden. Damit konnte die Verschiebung des pH-Gradienten Richtung Kathode verhindert werden. Zusätzlich aber war bei einheitlicher Konduktivität und Pufferkapazität eine höhere Trennschärfe und Probenkapazität erreicht worden. Im Anschluss an die Auftrennung ist über verschiedene Techniken eine Analyse einzelner Proteine aus dem erhaltenen Muster möglich. So werden etwa Massenspektroskopien und Aminosäuresequenzierungen durchgeführt. Damit schließlich wird die 2D-Elektrophorese zu einem Herzstück der Proteomforschung [100].



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Für die Entwicklung der Methode wurde Serum von männlichen Patienten mit unterschiedlichem PSA-Gehalt aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums der Charité verwendet. Das Serum wurde aus Vollblut durch 10 min Zentrifugation bei 1600 g und Abpipettieren des Überstandes gewonnen. Das Gesamt-PSA und das freie PSA wurden mit PSA-Testen an den Geräten Immulite 2000 und Elecsys 2010 bestimmt.

Für die Überprüfung der Validität der erarbeiteten Methode wurden 100 Seren, jeweils 50 Seren von Patienten mit einem PCa (mittleres Alter 65 Jahre, Bereich von 48 – 76 Jahren) bzw. von Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie (mittleres Alter 65 Jahre, Bereich von 52 – 79 Jahren) mit einem Gesamt-PSA zwischen 1 µg/l und 40 µg/l verwendet. Es wurden hierbei nur Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose ausgewählt. Im Falle eines PCa erfolgte die Diagnose durch ultraschallgesteuerte transrektale Oktantenbiopsie der Prostata. Bei BPH stellte sich die Diagnose nach histologischer Untersuchung des durch transurethrale Prostatektomie oder offene Adenektomie erhaltenen Prostatagewebes. Die Blutproben wurden in der Zeit von Dezember 2002 bis Januar 2004 gesammelt und zwischen Januar 2003 und Januar 2004 ausgewertet. Die Blutproben wurden den Patienten frühestens 4 Wochen nach digital rektaler Untersuchung, transrektalem Ultraschall oder Prostatastanzbiopsie und im Falle eines PCa vor radikaler Prostatektomie, Radio- oder Hormontherapie abgenommen. Aus dem Vollblut wurde wie oben beschrieben innerhalb von 2 Stunden nach Venenpunktion Serum gewonnen. Dieses wurde bei –80 °C gelagert. Die Verwendung der Blutproben wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt.

Für die Methodenerarbeitung einzelner Arbeitsschritte wurde auch gepooltes Seminalplasma (tPSA 0,68 g/l, fPSA 0,26 g/l) verwendet. Dies wird im Folgenden bei den entsprechenden Untersuchungen angegeben.

## 2.2 Analytische Techniken

### 2.2.1 Immunsorption

Die direkte Immunsorption diente der Isolierung von freiem bzw. Gesamt-PSA aus dem Serum. In Vorversuchen wurden zwei Verfahren getestet. Beide folgen dem gleichen Prinzip. Dabei wird das PSA über kleine mit Antikörpern gegen PSA beschichtete „Kügelchen“ (im Folgenden wird der gebräuchliche Begriff Beads verwendet) aus dem Serum isoliert.

In dem ersten Verfahren benutzte ich Sepharosebeads (PSM 773 Affinity Resin), die mit dem Antikörper PSM 773 der Firma Hybritech (jetzt Beckman-Coulter) gekoppelt waren. Das Reagenz ist kommerziell nicht erhältlich und wurde von der Firma zur Verfügung gestellt. Es wurde bereits bei anderen Fragestellungen zur Isolierung von Gesamt-PSA eingesetzt. Das Protokoll zur Verwendung der Sepharosebeads lautete wie folgt:

50 µl der Beadssuspension (1,0 mg Antikörper / ml Resin in 20 % Ethanol) wurden 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Beads wurden mit 300 µl PBS (0,15 mol NaCl; 10 mmol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt) gewaschen und dann erneut in 300 µl PBS suspendiert. Hierzu wurden 250 µl Serum gegeben und zusammen für 2 h auf einem Rautenschüttler inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Es folgten 3 Waschvorgänge mit je 250 µl PBS. Durch Inkubation des Niederschlags (Pellets) für 10 min in 225 µl einer Harnstoff-DTT-Lösung (Im Folgenden als Rehydratisierungslösung bezeichnet: 8,3 mol/l Harnstoff, 2 mol/l Thioharnstoff, 4 % 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat [CHAPS], 2 % IPG-Puffer [pH 3 – 10], 100 mmol/l Dithiothreitol [DTT], Bromphenolblau) wurde das isolierte PSA eluiert und konnte einer 2D-Elektrophorese zugeführt werden.

In dem zweiten und schließlich auch favorisierten Verfahren erfolgte die Immunsorption mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten magnetischen Beads, an die ein biotinylierter Antikörper gegen PSA (anti-tPSA M36-IgG bzw. anti-fPSA M30-IgG, monoklonale Mausantikörper, die auch im Roche Diagnostics ELECSYS-Test für t- bzw. fPSA verwendet werden) gekoppelt war.

Im ersten Schritt wurden die Beads, die mit Streptavidin beschichtet waren, gewaschen. 1 ml einer Suspension dieser Magnetbeads (0,72 mg/ml) wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Es folgte die Separierung der Beads mit einem Magnetseparator. Danach wurde der Überstand abgesaugt. Nach Zugabe von 1 ml TTBS (1 % Triton-X 100 in TBS-Puffer [0,2 mol/l Tris, 5 mol/l NaCl]) und kurzem Aufschütteln mit einem Vortexmischgerät, wurde die Suspension für

5 min auf einem Horizontalschüttler gemischt. Die Beads wurden erneut separiert. Dieser Waschvorgang wurde 3-mal wiederholt.

Anschließend erfolgte die Kopplung von biotinylierten PSA-Antikörpern an die Streptavidin-beladenen Beads. 500 µl der Antikörpersuspension (33,3 µg/ml in TBS) wurden hinzugefügt und unter Schütteln für 30 min inkubiert. Nach Separierung der Beads wurden diese erneut, wie beschrieben, 3-mal gewaschen.

Danach erfolgte die eigentliche Immunsorption. Dazu wurden die Beads mit 1 ml Serum unter Schütteln für 1 h inkubiert. Es resultierte ein Bead-Antikörper-Antigen-Komplex. Wieder wurden die Beads separiert und 3-mal gewaschen und damit das restliche Serum mit allen nichtkomplexierten Bestandteilen entfernt.

Im letzten Schritt wurde der genannte Komplex gespalten und das isolierte PSA eluiert. Dafür wurden die Beads 10 min mit 225 µl Rehydratisierungslösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads separiert und verworfen.

Das vorliegende Eluat konnte nun der Auftrennung mittels 2D-Elektrophorese zugeführt werden.

## 2.2.2 Durchführung der 2-Dimensionalen Elektrophorese

Eingebracht in eine Gelmatrix findet hierbei eine Auftrennung der Proteine entsprechend des isoelektrischen Punktes (Isoelektrische Fokussierung, 1. Dimension) und ihres Molekulargewichtes (SDS-PAGE, 2. Dimension) statt.

### 2.2.2.1 Durchführung der 1. Dimension:

#### Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-IEF)

In der 1. Dimension wurde die Probe mittels Rehydratisierung in einem getrockneten Polyacrylamid-Gel-Streifen [101] mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) eingebracht und unter steigender Spannung nach dem Prinzip einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) aufgetrennt.

Als Gele der 1. Dimension wurden selbst gegossene 12-cm-IPG-Polyacrylamid-Trockenstreifen mit einem Gradienten von pH 4 - 10 und einem vor- bzw. nachliegenden Plateau von pH 4 bzw. pH 10 verwendet. Die Polyacrylamidmatrix hatte eine so genannte T30-C4-Konfiguration. Dabei steht das T für die Totalacrylamidkonzentration in Prozent des Gesamtvolumens und das C für die Vernetzerkonzentration (also den Vernetzungsgrad und damit die Porengröße) in Prozent des Acrylamidvolumens.

Das Gießen der Gele erfolgte, dem Prinzip einer Titration folgend, mit drei computergesteuerten Büretten [102] von denen die erste die saure und die zweite die basische Lösung enthielt. Die dritte Bürette enthielt 2,5 % Ammoniumpersulfat zur Polymerisation. Gegossen wurde in 0,5 cm dicke und 30 x 20 cm große Glaskammern. Diese bestanden aus einer Glasplatte, randständigen 0,5 cm dicken Abstandhaltern, einer eingespannten GelBond-Folie und einer weiteren Glasplatte. Dabei wurde erst das 2 cm hohe Plateau mit einer sauren Fraktion (pH 4) gegossen, dann der pH-Gradient aus der sauren und einer alkalischen Fraktion (pH 10) titriert (8 cm) und schließlich das 2 cm hohe Plateau mit der alkalischen Fraktion gegossen.

Die saure Lösung bestand aus Immobilinen mit einem pK 1 (154,0 µl), pK 4,6 (145,0 µl), pK 6,2 (171,0 µl), 0,7 ml T30 C4 – Lösung (28,8 g Acrylamid, 1,2 g Bisacrylamid, Aqua dest. ad 100 ml), 1,9 ml KBr (240 g/l), 8,55 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED), 712 µl 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure in Hydroxymethyl aminomethan (Tris-MOPS), 34,2 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS) und Aqua dest. ad 5,7 ml, die alkalische Lösung aus den Immobilinen pK1 (17,9 µl), pK 6,2 (51,4 µl),

pK 7 (68,2 µl), pK 8,5 (25,7 µl), pK 9,6 (48,1 µl), 0,7 ml T30 C4, 1,9 ml KBr (80 g/l), 8,55 µl TEMED, 712 µl Tris-MOPS, 34,2 µl APS und Aqua dest. ad 5,7 ml.

Nach dem Gießen ließ man die Gele 10 min bei Raumtemperatur, dann 1 h bei 50°C auspolymerisieren. Darauf wurden die Glaskassetten geöffnet, die Gele entnommen und zur Beseitigung von Immobilinresten 1 h in 1 % Glycerinlösung bei viermaligem Lösungswechsel geschwenkt. Schließlich wurden die Gele in der Mikrowelle getrocknet, mit einer Schutzfolie bedeckt (Kopierfolie) und in 0,4 cm breite Streifen geschnitten (dabei wurde, um das saure Ende zu markieren, dieses spitz zugeschnitten). In diesem Zustand konnten sie bis zur Verwendung bei –20 °C aufbewahrt bzw. gleich der Rehydratisierung zugeführt werden.

Bei der Rehydratisierung erfolgte unter schwacher Spannung die Applikation des Eluates aus der Immunsorption in den Gelstreifen. Dazu wurden 225 µl Probe gleichmäßig in ein 12-cm-Keramikschißchen (Dry Strip Holder) getropft und vorsichtig mit einem Gelstreifen bedeckt, dessen Schutzfolie zuvor abgezogen wurde. Dabei war darauf zu achten, dass die Gelseite des Streifens nach unten wies und dessen saures Ende sich über der späteren Anode befand. Das Gel musste außerdem luftblasenfrei der Probe aufliegen. Anschließend wurde alles mit 800 µl Paraffinöl und dem Plastikdeckel des Schißchens bedeckt, um eine Verdunstung zu verhindern. Das Schißchen wurde auf dem IPGphor platziert. Dieser war so programmiert, dass die Probe über 6 h bei einer Spannung von 30 V und weitere 6 h bei einer Spannung von 60 V in das Gel diffundierte (bei 0,05 mA pro IPG-Streifen) [103].

Der Rehydratisierung schloss sich unmittelbar die isoelektrische Fokussierung an. Bei steigender Spannung (1 h 100 V; 1 h 200 V; 1 h 500 V; 30 min 1000 V; 2,5 h 8000 V) trennten sich die in der Probe enthaltenen Proteine entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte entlang dem pH-Gradienten des Gels auf. Nach abgeschlossener Trennung wurde der Gelstreifen dem Schißchen entnommen.

### 2.2.2.2 Durchführung der 2. Dimension:

#### SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

In der 2. Dimension, einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE), wurden die Proteine entsprechend ihrer Molekülmassen aufgetrennt. Es wurden die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoff- und Schwefelbrücken aufgelöst, stabilisiert und gestreckt in Natriumdodecylsulfat (SDS) beladene ellipsoide Micellen verwandelt.

Um dies zu erreichen wurden die Gelstreifen aus der 1. Dimension an deren Enden in einer Schale fixiert, für 10 min in einer reduzierenden Lösung (6 mol/l Harnstoff, 100 mmol/l DTT, 2 % SDS, 30 % Glycerin, 0,5 mol/l Tris-HCl-Puffer) und anschließend für 10 min mit einer SH-Gruppen-stabilisierenden Lösung (6 mol/l Harnstoff, 260 mmol/l Iodacetamid, 2 % SDS, 30 % Glycerin, 0,5 mol/l Tris-HCl-Puffer) äquilibriert.

Bei diesem Vorgang werden Schwefelbrücken, die zwischen Cystein gebildet werden können, durch das DTT aufgespalten und durch deren Alkylierung von Iodacetamid stabilisiert. SDS spaltet die Wasserstoffbrücken. Zudem ist SDS ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung der Proteine überdeckt, wodurch anionische Micellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit Protein entstehen. Damit wird eine einheitliche Wanderungsrichtung (Richtung Kathode) im elektrischen Feld gewährleistet. Die mit SDS beladenen, gestreckten Molekülketten bilden Ellipsoide mit gleichen Mittelabständen. Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungstrecken dieser Micellen. Mit Hilfe von Markerproteinen lassen sich dann über eine Eichkurve die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Im Anschluss an diese Prozedur entfernte man durch vorsichtiges Abtupfen des Gelstreifens auf einem nassen Zellstofftuch überschüssiges Iodacetamid. Nun wurde der Streifen an beiden Enden um 2 cm gekürzt. In diesen beiden Abschnitten waren all jene Proteine lokalisiert, die ihren isoelektrischen Punkt bei pH 10 oder darüber bzw. bei pH 4 oder darunter haben. Somit verblieb ein 8 cm langer Gelstreifen, auf dem alle relevanten Proteine vorhanden, randständige irrelevante Proteine jedoch entfernt waren.

Für die 2. Dimension wurden selbst gegossene 8 x 8 x 0,5 cm Gele aus Polyacrylamid (T15 C0,5) verwendet.

Die Gellösung bestand aus 50 % T30 C0,5 (30 % Acrylamid, 0,15 % Bisacrylamid, Aqua dest.), 25 % Puffer D (PBS [120 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl und 10 mmol/l Phosphat-Puffer] pH 7,4)

mit 0,1 % Rinderserumalbumin [BSA]), 0,043 % Natriumthiosulfat, 0,1 % SDS und 0,02 % TEMED. Nach halbstündigem Entgasen mittels Wasserstrahlpumpe konnte der Polymerisationsstarter APS in einer Konzentration von 0,05 % unter Rühren hinzugegeben werden. Die Gellösung wurde anschließend zügig in die horizontal stehende Gelkassette gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Das Acrylamid musste eine Stunde bei Raumtemperatur auspolymerisieren. Im Anschluss konnte das Gel benutzt oder bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden.

Nachdem das abdeckende Butanol von dem Gel der 2. Dimension ab gespült wurde, konnte der Gelstreifen der 1. Dimension hochkant aufgelegt werden. Der verbleibende Spalt wurde mit einer heißen, flüssigen Abdecklösung (0,024 mol/l Tris, 0,02 mol/l Glycin, 0,1 % SDS etwas Bromphenolblau, mit 0,5 % Agarose aufgekocht) abgedichtet. War die Lösung polymerisiert, konnte der Schutzstreifen über dem Schlitz an der Unterkante der Kassette entfernt werden und die Kassette in die Vertikalkammer (XCELL II MiniCell) der 2. Dimension gestellt werden.

Nach dem Auffüllen der Kammer mit Laemmli-Puffer [104] (25 mmol/l Trisbase, 192 mmol/l Glycin, 0,1 % SDS), wurde die Elektrophorese durch Anlegen einer Stromstärke von 5 mA pro Gel gestartet. Nach 1 h wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht und so lange belassen, bis die Bande des Bromphenolblaus an das untere Ende des Gels gewandert war. Damit war die Auftrennung abgeschlossen, die Kassette konnte vorsichtig aufgebrochen und das Gel entnommen werden.

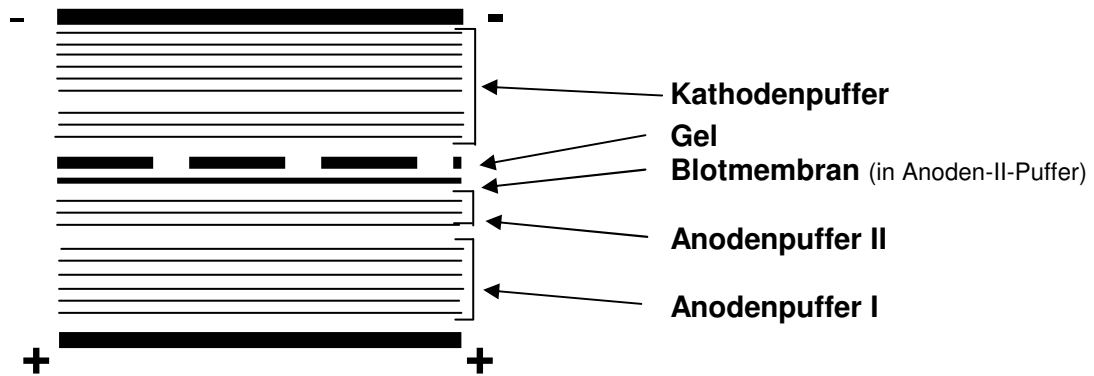
### 2.2.3 Western-Blot-Technik

Im Western-Blot wurden die Proteine aus der Gelmatrix auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) übertragen. Dies ermöglichte eine Immobilisation der Proteine, wobei sie frei zugänglich für großmolekulare Liganden (beispielsweise Antikörper bei Immunfärbeverfahren) blieben.

Dies erfolgte im Semi-Dry-Blot-System mit diskontinuierlichem Puffersystem [105]. Hierbei wurden 18 Filterpapiere und eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer-Membran mit 0,45 µm Porengröße) wurde durch einmaliges Schwenken in Methanol hydrophil gemacht. Überschüssiges Methanol wurde anschließend mit Aqua dest. ab gespült.

Die ersten 6 Lagen Filterpapier wurden in Anodenpuffer I (0,3 mol/l Trisbase, 0,01 % Natriumazid, 20 % Methanol) getränkt und der Anode der Blotapparatur (SemiPhor) aufgelegt. Darüber folgten 3 Lagen in Anodenpuffer II (25 mmol/l Trisbase, 0,01 % Natriumazid, 20 %

Methanol) getränktes Filterpapier, die Blotmembran, das Gel aus der 2. Dimension und abschließend 9 Lagen in Kathodenpuffer (40 mmol/l 6-Aminohexansäure, 0,01 % SDS, 0,01 % Natriumazid, 20 % Methanol) getränktes Filterpapier (s. Abbildung 2). Beim Schichten der verschiedenen Lagen war es erforderlich, mit einem Glasspatel etwaige Luftblasen auszustreichen.



**Abbildung 2**  
**Aufbau der Blotapparatur beim Semidry-Blot-Verfahren**

Die Blotkammer wurde mit der Kathode verschlossen. Der Blotvorgang erfolgte nun bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche über 1 h bei einer eingestellten maximalen Spannung von 10 V und Leistung von 20 W. Im Anschluss konnte das Gel zur Kontrolle des Transfers gefärbt werden (Silber- oder Coomassie-Färbung). Die Blotmembran wurde für 30 min bei 37 °C getrocknet. In diesem Zustand konnte sie bei -20 °C gelagert werden oder der Immunfärbung zugeführt werden.

#### 2.2.4 Immunfärbung

Bei der Immunfärbung wurde die PSA-Fraktion mit spezifischen Antikörpern über eine Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Vorab musste die Blotmembran wieder in Methanol geschwenkt und mit Aqua dest. gewaschen (3-mal 1 min) werden. Die Prozedur begann mit der Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch einstündiges Inkubieren in einer 1 % Caseinlösung (Casein in TBS-Puffer, pH 7,5) unter Schütteln.

Darauf folgte die Kopplung mit dem ersten Antikörper, einem polyklonalen anti-PSA vom Kaninchen (1:2000 verdünnt mit TBS-Puffer und 0,5 % Casein) ebenfalls für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur.



Durch 3-mal 5 min Waschen in einer 0,1 % Tween-20-Lösung (in TBS-Puffer) wurden freie, unverbrauchte Antikörper entfernt.

Im dritten Schritt erfolgte die Kopplung eines POD-markierten Antikörpers gegen Kaninchenimmunglobulin (1:2000 verdünnt mit TBS-Puffer und 0,5 % Casein) an das anti-PSA durch einstündige Inkubation unter Schütteln.

Nach erneutem Waschen mit großen Volumina (mind. 50 ml) von 0,1 % Tween-20-Lösung wurde die Chemolumineszenzreaktion ausgelöst. Dazu wurden 5 ml der ECL Plus-Lösung (eine Luminollösung mit Enhancer 1:40) auf die Membran getropft, für 5 min inkubiert, diese dann abgegossen und die Blotmembran luftblasenfrei zwischen 2 Kopierfolien gelegt. Dieser Vorgang musste zügig ausgeführt werden, da das Lumineszenzsignal entgegen der Herstellerangabe nach wenigen Minuten nachließ. Dann erfolgte die Aufnahme im Fluor-S Multimager. Hier fand die digitale Erfassung der Lumineszenzsignale mit einer Belichtungszeit von 5 Minuten statt.

### **2.2.5 Auswertung**

Die Auswertung der erhaltenen Proteinmuster wurde über optische Beurteilung und die PDQuest-Software vorgenommen. Aus den erhaltenen Bildern der BPH- und PCa-Proben wurden jeweils Matchsets entsprechend der Bedienungsanleitung zum PDQuest-System angefertigt. Dabei wurde quantitativ die Fleckenintensität und qualitativ das Fleckenmuster gemessen und bewertet (im Weiteren wird der gebräuchliche Begriff Spots statt Flecken verwendet). In einem übergeordneten Matchset konnten die Spotintensität und das Spotmuster der Gesamtheit von BPH-Proben mit jenen der Gesamtheit von PCa-Proben miteinander verglichen werden.

Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der statistischen Computerprogramme SPSS 12.01 für Windows (SPSS Inc.), MedCalc 7.4.2.0 (MedCalc Software), und GraphPad Prism 4.01 für Windows (GraphPad Software) ausgewertet. Es wurden nichtparametrische ANOVA-Analysen entsprechend Kruskal-Wallis, der Mann-Whitney U-Test, der Spearman-Korrelationskoeffizient sowie logistische Regressionen berechnet. ROC-Analysen wurden ebenfalls mit dem MedCalc-Programm erstellt. Statistisch relevante Unterschiede wurden bei  $P < 0,05$  angesetzt.

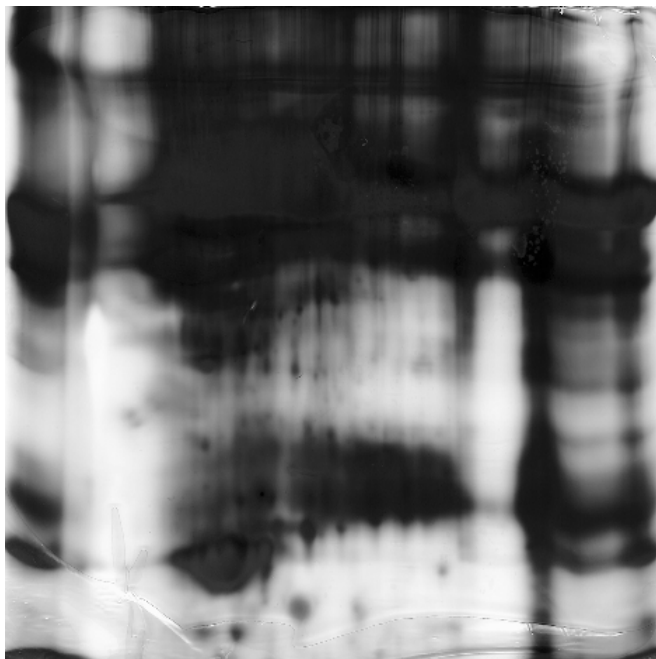
### 3 Ergebnisse

Entsprechend der Aufgabenstellung der Arbeit gliedert sich die Darstellung der Ergebnisse in zwei Teile, die Erarbeitung der Methode und die Darstellung von ersten Ergebnissen zur diagnostischen Validität des Analyseverfahrens.

#### 3.1 Optimierung der Methode

##### 3.1.1 Nativserum als Probe für die Detektion von fPSA-Subformen

Ursprünglich wurde das Probenserum direkt in die unter 2.2.1 beschriebene, denaturierende Rehydratisierungslösung gegeben. So wurde die ganze Prozedur der 2D-Elektrophorese, des Western-Blots und der Immundetektion mit allen Bestandteilen des menschlichen Serums durchgeführt. Schnell zeigte sich, dass für eine saubere Trennung im Rahmen der 2D-Elektrophorese eine Gesamtproteinmenge von maximal 100 µg nicht überschritten werden sollte. Bei einer Gesamtproteinkonzentration von ca. 70 g/l entspricht dies einer Auftragsmenge von ca. 1,5 µl Serum. Bei größeren Mengen war die Auftrennungsqualität unzureichend, was sich optisch bei einem silbergefärbten Gel (als Zwischenergebnis nach der 2D-Elektrophorese) als vor allem vertikal „verschmiertes“ Bild darstellte.



**Abbildung 3**  
**2D-Elektrophorese und Silberfärbung**  
**einer Serumprobe**  
(100 µg Gesamtprotein)

Unter diesen Bedingungen ergab sich eine hohe Anforderung an die untere Detektionsgrenze von tPSA bzw. fPSA aus dem Serum. Dies resultiert aus folgenden Berechnungen.

Es bestand die Aufgabe, in Seren mit einem Gesamt-PSA von 1 – 20 µg/l das Muster der fPSA-Subformen zu charakterisieren. Da die fPSA-Fraktion ca. 10 - 30 % des tPSA ausmacht, muss bei einem Auftrag von ca. 1,5 µl Serum die Analytik so optimiert sein, dass noch ca. 0,1 pg fPSA sicher detektiert werden.

Zur Bestimmung der zu diesem Zeitpunkt möglichen unteren Detektionsgrenze von fPSA in der 2D-Elektrophorese wurde Seminalplasma verwendet. Seminalplasma hat, wie beschrieben, eine um den Faktor  $10^8$  größere tPSA-Konzentration als Serum. Daher ist es möglich, mit weitaus geringeren Volumina große Mengen an PSA für die Detektion einzubringen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe aus Seminalplasma mit fPSA-Mengen von 0,004; 0,04; 0,19; 0,38; 3,8 und 38 ng hergestellt. Diese 6 Proben wurden einer 2D-Elektrophorese und anschließend einem Western-Blot zugeführt. Es zeigte sich, dass unterhalb einer fPSA-Menge von 3,8 ng nach erfolgter Immundetektion keine Spots mehr sichtbar gemacht werden konnten.



**Abbildung 4**

**2D-Elektrophorese und Immundetektion einer Seminalplasmaverdünnungsreihe**

a) 38 ng fPSA b) 3,8 ng fPSA c) 0,38 ng fPSA

(Die hirschgeweiartigen Ausziehungen und die scharf gezeichneten Mikroflecken sind Artefakte)

Bei dem bisher einsetzbaren Serumvolumen von ca. 1,5 µl könnten somit erst Proben mit einer fPSA-Konzentration von etwa über 2000 µg/l (bzw. über 7000 µg/l tPSA) zu sichtbaren Ergebnissen führen. Wie schon beschrieben, wurde jedoch beabsichtigt, Patientenserum mit einer tPSA-Konzentration von 1 – 20 µg/l zu untersuchen. Bei ca. 1,5 µl Probenvolumen bedeutete dies eine fPSA-Menge der Probe von ca. 0,14 – 8,4 pg. Darüber hinaus war zu erwarten, dass sich die fPSA-Fraktion im Rahmen der 2D-Elektrophorese in mehreren Spots darstellt. Damit bewegt sich die absolute Menge einer in der Probe enthaltenen fPSA-Isoform (in Abhängigkeit von der Anzahl der Isoformen und deren Relation zu einander) im unteren Femtogrammbereich.

Es boten sich folgende Lösungsvarianten an:

1. Abtrennung störender Proteine (Albumin, Immunglobuline), um durch eine erhöhte Probenmenge die PSA-Detektion zu verbessern,
2. Separation des PSA aus dem Serum und Elektrophorese der separierten Fraktion,
3. Verbesserung der Sensitivität des PSA-Nachweises

Meine durchgeführten Versuche und Ergebnisse zur Lösung dieser methodischen Aufgabe bespreche ich in dem anschließenden Kapitel „Aufbereitung der Serumproben für die 2D-Elektrophorese“, während die 3. Optimierungsvariante in den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 ausgeführt wird.

### **3.1.2 Aufbereitung der Serumproben für die 2D-Elektrophorese**

#### **3.1.2.1 Aufreinigung mit Cibacron Blue Agarose**

Mittels einer Batchmethode mit Fast Flow Cibacron Blue 3GA (immobilisiertes Cibacron Blue auf hochvernetzter 6 %iger Agarose) wurde versucht, Albumin und Immunglobuline aus dem Serum zu entfernen. Dies bot die Möglichkeit, ein höheres Ausgangsvolumen zu nutzen.

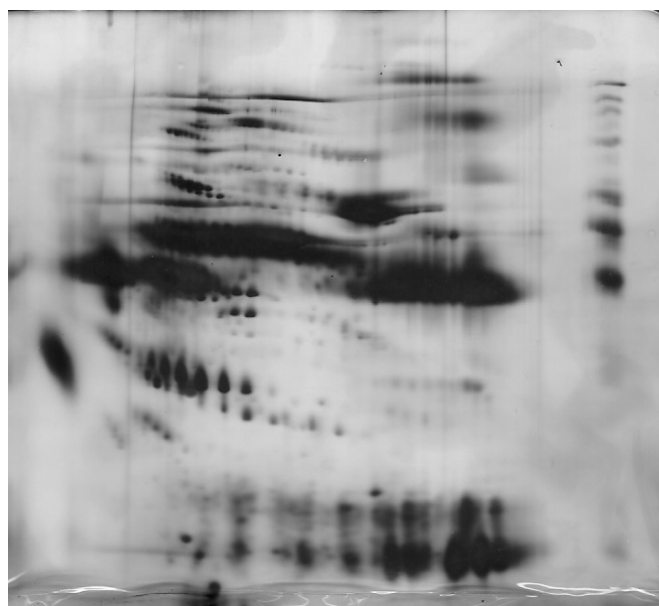
Dazu wurden 800 µl Cibacron Blue (in 1:1-Suspension) in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und für 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit 1000 µl PBS, das hieß Resuspension, Zentrifugation und Überstand abpipettieren. Nun wurden 200 µl Serum hinzugefügt und zusammen für 30 min in einem Rautenschüttler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation konnte das Pellet verworfen und der Überstand der 2D-Elektrophorese zugeführt werden. Das verwendete Serum wurde vor und nach der Aufreinigung auf seinen Gesamtprotein- und Albumingehalt untersucht.

Es wurden 4 Proben untersucht. Tabelle 4 enthält die Ergebnisse. Durch die Probenvorbereitung konnten also ca. 80 % der Gesamtproteine und ca. 90 % des Albumins entfernt werden. Dies zeigt auch Abbildung 5 im Vergleich zu Abbildung 3 sehr deutlich.

**Tabelle 4**  
**Gesamtprotein- und Albuminkonzentration in 4 Serumproben vor und nach der Aufreinigung mit Cibacron Blue Agarose.**

Probe	Gesamtprotein (g/l)		Albumin (g/l)	
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher
1	63,7	12,4 (19) <sup>a</sup>	34	3,6 (11) <sup>a</sup>
2	70,1	12,6 (18) <sup>a</sup>	43,1	3,5 (8) <sup>a</sup>
3	77,9	16,5 (21) <sup>a</sup>	42,8	3,9 (9) <sup>a</sup>
4	72,7	14,4 (20) <sup>a</sup>	44,4	4,3 (10) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> In Klammern sind die nach der Aufreinigung verbliebenen Proteinkonzentrationen in Prozent des Ausgangswertes angegeben.



**Abbildung 5**  
**2D-Elektrophorese und Silberfärbung einer mit Cibacron Blue aufbereiteten Serumprobe**

Vergl. Abbildung 3 ohne Aufbereitung des Serums

Damit wurde zwar ein Großteil der störenden Proteine durch die Probenvorbereitung eliminiert, doch bewegte sich der Proteingehalt in einer Probe immer noch im oberen Mikrogrammbereich. Wie schon beschrieben, ist das für die Durchführung der 2D-Elektrophorese unzulässig. Die ca. 80 %ige Entfernung der störenden Proteine erlaubt unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.1.1. angeführten maximal möglichen Trennung von 100 µg Gesamtprotein nun einen Einsatz von ca. 7 µl Probenvolumen. Werden die gleichen Annahmen und Berechnungen wie in Kapitel 3.1.1. zugrunde gelegt, wird auch durch diese Probenvorbereitung eine Detektion im Bereich von < 800 pg nicht möglich. Darüber hinaus war es nicht abschätzbar, ob mit dieser Aufreinigung nicht auch in Anteilen PSA verloren geht.

### 3.1.2.2 Aufreinigung mittels direkter Immunsorption

Da somit die Probenvorbereitung mittels Cibacron Blue ohne Erfolg war, wurde versucht, mittels direkter Immunsorption spezifisch PSA aus dem Serum zu extrahieren. Diese Methode bietet die Möglichkeit, hohe Serumvolumina für die Probenvorbereitung einzusetzen sowie durch die Verwendung verschiedener Antikörper unterschiedliche PSA-Fractionen zu erhalten.

Zu Beginn der Untersuchungen standen zwei Sorten Beads zur Verfügung:

- 1) Sepharosebeads (PSM 773 Affinity Resin, von Hybritech),  
bereits gekoppelt mit PSA-Antikörpern gegen fPSA und komplexiertes PSA
- 2) Magnetbeads (Roche), beladen mit Streptavidin,  
dazu standen folgende koppelbare PSA-Antikörper (Roche) zur Verfügung
  - biotinylierte monoklonale tPSA-Antikörper: MAK <tPSA> M36-Fab'-Bi oder
  - biotinylierte monoklonale fPSA-Antikörper: MAK <fPSA> M30-Fab'-Bi

Um das jeweilige Adsorptionspotenzial festzustellen sowie gleichzeitig ein optimales Mischungsverhältnis zwischen Magnetbeads und Antikörpern zu finden, wurden 9 Patientenserumproben (je 250 µl, PSA-Konzentrationen wie in Tabelle 5 angegeben) untersucht. Dabei wurden bewusst Seren mit sowohl niedrigen als auch extrem hohen PSA-Werten ausgewählt, um auch ein möglicherweise unterschiedliches Adsorptionsverhalten erfassen zu können.

**Tabelle 5**  
**PSA-Konzentrationen der für die Untersuchung des Adsorptionspotenzials von Magnet- und Sepharosebeads verwendeten Proben**

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9
tPSA (µg/l)	1,1	7,3	9,6	276,0	631,0	10,0	14,2	36,9	44,9
fPSA (µg/l)	0,16	1,3	0,4	27,1	10,1	1,6	1,0	1,4	4,3

Mit allen Proben wurde eine Immunsorption entsprechend der im Kapitel 2.2.1 aufgeführten Protokolle durchgeführt. Jeweils mit:

- Magnetbeads - 1:1 gekoppelt mit MAK <tPSA> M36-Fab'-Bi  
 - 2:1 gekoppelt mit MAK <tPSA> M36-Fab'-Bi  
 - 1:1 gekoppelt mit MAK <fPSA> M30-Fab'-Bi  
 - 2:1 gekoppelt mit MAK <fPSA> M30-Fab'-Bi

Sepharosebeads, bereits gekoppelt mit Antikörpern gegen fPSA und komplexiertes PSA

Zur Ermittlung der Adsorption durch diese Beads wurden nach folgenden Zwischenschritten beider Prozeduren die Überstände auf tPSA und fPSA untersucht:

- nach Inkubation der antikörperbeladenen Beads mit der Serumprobe. Hiermit erfasste man das nicht adsorbierte PSA, das im Serum verblieben war.
- Nach dem ersten und zweiten Waschschrift. Hiermit erfasste man das unspezifisch an den Beads und der Gefäßwand verbliebene PSA sowie PSA, das möglicherweise aus der Antikörperbindung wieder in Lösung gegangen war.

### **Tabelle 6**

#### **Ergebnisse der Immunsorption durch Magnetbeads und Sepharosebeads**

Aufgeführt sind die Adsorptionsraten für fPSA und tPSA als Durchschnitt gemessener tPSA- bzw. fPSA-Werte in Relation zu den gemessenen Serumwerten vor der Immunsorption und daraus resultierende Adsorptionsraten

Adsorptionsrate betreff	Verwendete Beads / Antikörper <sup>a</sup>				
	Magnet anti-tPSA (1:1)	Magnet anti-tPSA (2:1)	Magnet anti-fPSA (1:1)	Magnet anti-fPSA (2:1)	Sepharose anti-tPSA
tPSA	93,5 %	96,9 %	-	-	> 99,8 %
fPSA	94,4 %	97,5 %	90,2 %	87,3 %	> 99,8 %

<sup>a</sup> In Klammern ist das Mengenverhältnis von Beads zu Antikörpern angegeben

Prinzipiell war die Adsorptionsrate aller Methoden mit mindestens 87,3% gut. Das beste Ergebnis erzielten die Sepharosebeads mit einer Adsorptionsrate von über 99,8%.

Bei Verwendung von Magnetbeads war die Kombination mit tPSA-Antikörpern effektiver (97,5 %) als mit fPSA-Antikörpern (90,2 %). Dabei empfahl sich ein Mischungsverhältnis von 2:1 (Beads 0,72 mg/ml; tPSA-Antikörper 33,3 µg/ml), wohingegen bei der Kombination mit fPSA-Antikörpern ein Mischungsverhältnis von 1:1 vorteilhafter war.

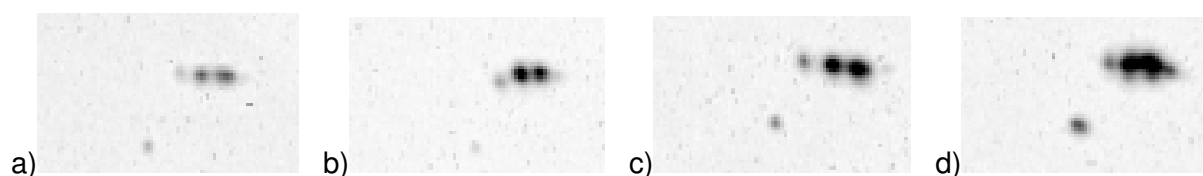
Aus den erhaltenen Daten dieser Untersuchung ließ sich ebenfalls der Nachweis über einen durch die Immunsorption unveränderten %fPSA erbringen (s. Tabelle 7). Das bedeutet, dass fPSA durch die Aufreinigungsprozedur weder in seiner Menge reduziert noch aus Komplexverbindungen herausgelöst wird.

**Tabelle 7**  
**Auswirkung der Immunsorption auf das Verhältnis von fPSA zu tPSA (%fPSA)**

Probe	Vor Immunsorption			Nach Immunsorption		
	tPSA	fPSA	%fPSA	tPSA	fPSA	%fPSA
6	10,00	1,60	<b>16,0</b>	9,86	1,56	<b>15,8</b>
8	36,90	1,40	<b>3,8</b>	36,11	1,36	<b>3,8</b>
9	44,90	4,30	<b>9,6</b>	44,04	4,22	<b>9,6</b>
4	276,00	27,10	<b>9,8</b>	272,90	26,82	<b>9,8</b>
5	631,00	10,10	<b>1,6</b>	620,20	9,89	<b>1,6</b>

Im Folgenden wurden Magnetbeads mit tPSA-Antikörpern (2:1) verwendet, da diese Methode einfacher zu handhaben war (mit Magnetseparator) und für die Zukunft mehr Gestaltungsmöglichkeiten aufgrund der Austauschbarkeit der Antikörper bot.

In einem weiteren Versuch wurde die Adsorptionskapazität der antikörperbeladenen Beads (biotinylierte Magnetbeads gekoppelt mit MAK <tPSA> M36-Fab'-Bi) untersucht. Dazu wurde die Immunsorption von 1, 2, 5 bzw. 9 ml Serum eines Pools von 20 Seren (0,95 µg/l tPSA; 0,14 µg/l fPSA) mit 750 µl Beads-Antikörper-Gemisch (0,72 mg/ml Beads und 33,3 µg/ml tPSA-Antikörper im Verhältnis 2:1) durchgeführt. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse nach 2D-Elektrophorese, Western-Blot und Immundetektion dargestellt.



**Abbildung 6**  
**Detektion von fPSA-Subformen bei Einsatz unterschiedlicher Probenvolumina für die Immunsorption.** Die unter a – d aufgeführten Bilder entsprechen dem Ergebnis von 1, 2, 5 bzw. 9 ml Serum

Es zeigte sich, dass mit steigendem Serumeinsatz immer noch ein stärkeres Signal erzeugt werden konnte. Folglich war die Anzahl der antikörperbeladenen Beads in diesem Bereich nicht der limitierende Faktor der PSA-Detektion.



Prinzipiell war zu erwarten, dass mit der Probenmenge auch die Signalintensität steigt. Aufgrund der Verfügbarkeit von Serumproben einzelner Patienten beschränkte ich mich im Weiteren auf ein Probenvolumen von 1 ml Serum.

Abschließend lässt sich somit für den Prozess der Probenvorbereitung feststellen, dass die Immunsorption sich als einzig praktikable Variante erwies, fPSA-Subformen mit Hilfe der 2D-Elektrophorese darzustellen. In den weiteren Ausführungen werde ich die Methodenoptimierung der Elektrophorese und Immundetektion beschreiben.

### 3.1.3 2-Dimensionale Elektrophorese

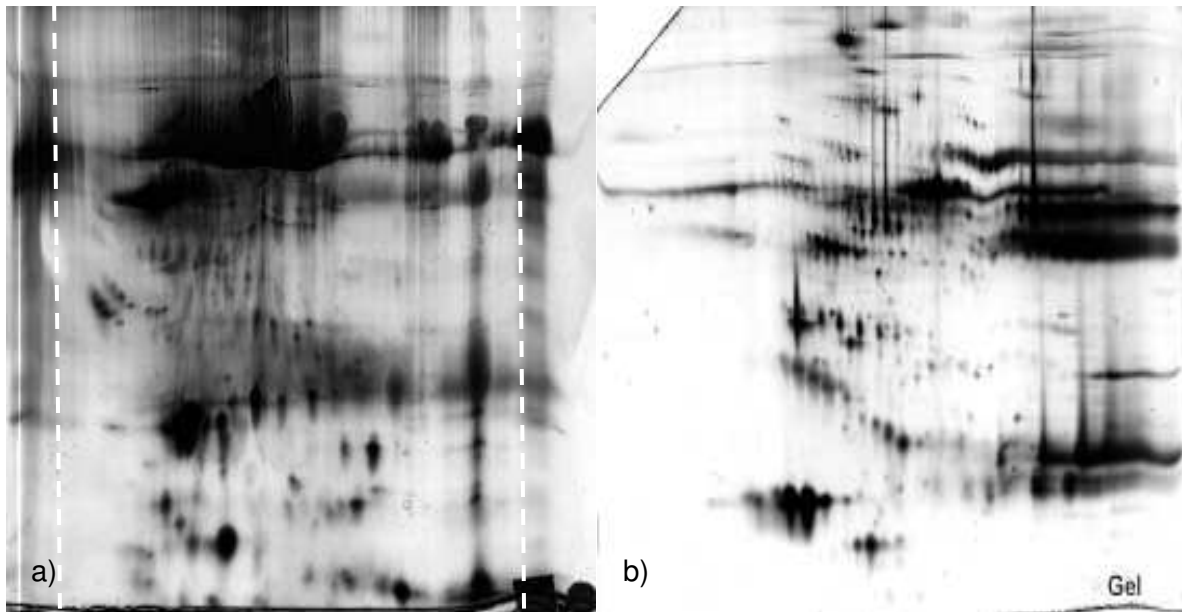
#### 3.1.3.1 Die isoelektrische Fokussierung als 1. Dimension

Die isoelektrische Fokussierung stellt den ersten Schritt der Auftrennung der durch die Immunsorption isolierten Serumproteine dar. Hier war es ebenso erforderlich, methodische Voruntersuchungen zur optimalen Darstellung der fPSA-Subformen durchzuführen.

Ursprünglich habe ich mit 7 cm langen Gelstreifen gearbeitet, die einen nichtlinearen, immobilisierten pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10 aufweisen (Immobiline polyacrylamid DryStrips von Amersham Pharmacia). Dies hatte den Nachteil, dass sich alle Proteine, die ihren isoelektrischen Punkt bei pH 3 oder darunter bzw. bei pH 10 oder darüber besitzen, an den Enden des Gelstreifens sammelten. Das ließ sich auch nicht durch längere Fokussierungszeiten ändern. So war an beiden Gelenden jeweils ein ca. 1 cm breiter Streifen unspezifischer Proteine zu verzeichnen (s. Abbildung 7 a). Die Folge war, dass nicht die gesamte Länge des Gels zur Trennung ausgenutzt werden konnte.

Daher wurde ein Gel mit einer Ausgangslänge von insgesamt 12 cm eingeführt. Es beinhaltet ein 2-cm-Plateau bei pH 4 gefolgt von einem 8 cm langen nichtlinearen pH-Gradienten von pH 4 – 10 und schließlich ein 2-cm-Plateau bei pH 10.

Hierbei sammelten sich alle für die Untersuchung irrelevanten Proteine mit einem isoelektrischen Punkt jenseits des Bereiches pH 4 – 10 in den Gelabschnitten der endständigen pH-Plateaus. Diese wurden nach Abschluss der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) abgetrennt und verworfen. Der mittlere Gelabschnitt wurde so in ganzer Breite des Gradienten genutzt. Nur dieser Abschnitt wurde im Weiteren der 2. Dimension zugeführt (s. Abbildung 7 b).

**Abbildung 7****2D Elektrophorese einer Serumprobe, IPG-Streifen mit verschiedenen pH-Gradienten**

a) Kommerzielle IPG-Streifen pH 3 - 10 (gestrichelte weiße Linie markiert unspezifischen Randbereich)

b) Selbst gegossene IPG-Streifen mit Plateau bei pH 4, nichtlinearem Gradienten von pH 4 bis 10 und Plateau bei pH 10

Die Art der Probenapplikation, also das Einbringen der Proteine in die Gelmatrix erschien ebenfalls als wichtige analytische Variable.

Drei Varianten standen hier zur Wahl:

- a. Probenapplikation nach Rehydratisierung der IPG-Streifen,
- b. Probenapplikation im Rehydratisierungspuffer spannungsfrei
- c. Probenapplikation im Rehydratisierungspuffer unter Spannung

Aus einem Serumpool wurden je 4 Proben entsprechend einer der 3 oben aufgeführten Applikationsverfahren in die IPG-Streifen eingebracht.

a) Probenapplikation nach Rehydratisierung der IPG-Streifen:

Hierbei erfolgte die Rehydratisierung der IPG-Streifen mit 400 µl Rehydratisierungspuffer über 5 h in luftabgedichteten Pipetten. Es folgte die Applikation der Serumproben auf einem kleinen Filterpapierstück, das im Bereich des alkalischen Plateaus auf den IPG-Streifen positioniert wurde. Daraufhin wurde die eigentliche IEF im 2117 Multiphor II gestartet:

5 h	100 V
12 h	400 V
0,5 h	1000 V
1 h	3000 V

b) Probenapplikation im Rehydratisierungspuffer, spannungsfrei:

Zunächst fand die Rehydratisierung mit 400 µl Rehydratisierungspuffer und der Serumprobe über 15 h in einer Rehydratisierungskammer statt.

Anschließend erfolgte die IEF im 2117 Multiphor unter folgenden Bedingungen:

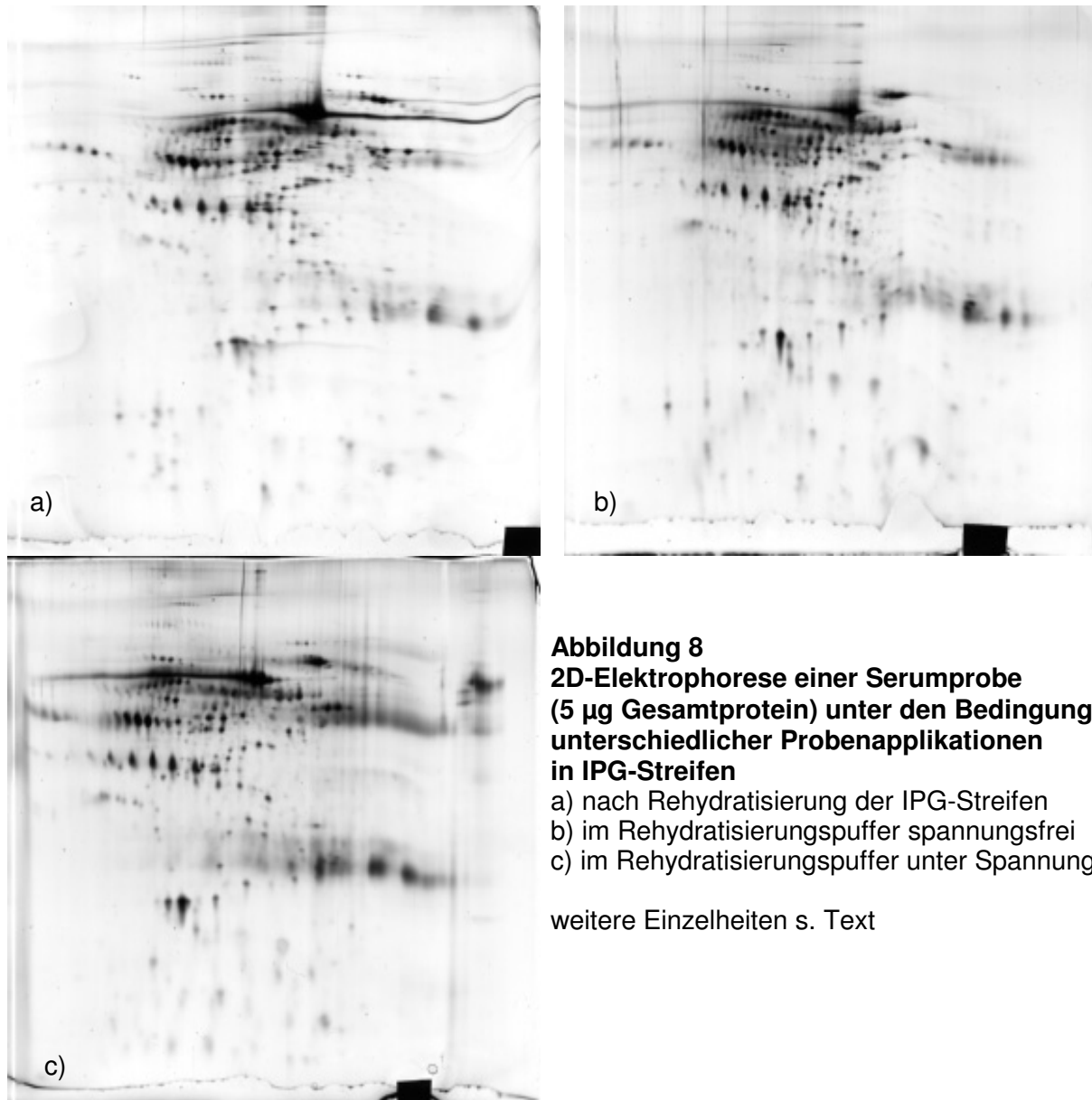
1 h	100 V
1 h	200 V
1 h	500 V
0,5 h	1000 V
2,5 h	3000 V

c) Probenapplikation im Rehydratisierungspuffer unter Spannung [106]:

Hier erfolgte die Rehydratisierung der IPG-Streifen über 12 h mit 400 µl Rehydratisierungspuffer und der Serumprobe unter leichter Spannung mit sich unmittelbar anschließender IEF im IPGphor mit 12 cm langen Keramikschißchen („strip holder“) unter folgenden Bedingungen:

12 h	6 h 30 V/ 6 h 60 V Rehydratisierung
1 h	100 V
1 h	200 V
1 h	500 V
0,5 h	1000 V
2,5 h	8000 V

Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im abschließenden Vergleich der silbergefärbten Gele. Der Applikationsform im Rehydratisierungspuffer unter niedriger Spannung ist wegen besserer Auftrennung und einfacherer Handhabung der Vorzug zu geben.



**Abbildung 8**  
**2D-Elektrophorese einer Serumprobe**  
**(5 µg Gesamtprotein) unter den Bedingungen**  
**unterschiedlicher Probenapplikationen**  
**in IPG-Streifen**

a) nach Rehydratisierung der IPG-Streifen  
b) im Rehydratisierungspuffer spannungsfrei  
c) im Rehydratisierungspuffer unter Spannung

weitere Einzelheiten s. Text

Um im Weiteren die Rehydratisierungsbedingungen zu optimieren, wurde zunächst das maximale Aufnahmevolumen von 12-cm-IPG-Streifen ermittelt und dann entsprechend ein Vergleich des herkömmlich verwendeten Volumens mit dem Maximalvolumen an Rehydratisierungspuffer im Rahmen einer vollständigen 2D-Elektrophorese angestellt. Schließlich wurde die Auswirkung von Thioharnstoff zusätzlich zu dem im Rehydratisierungspuffer enthaltenen Harnstoff untersucht.

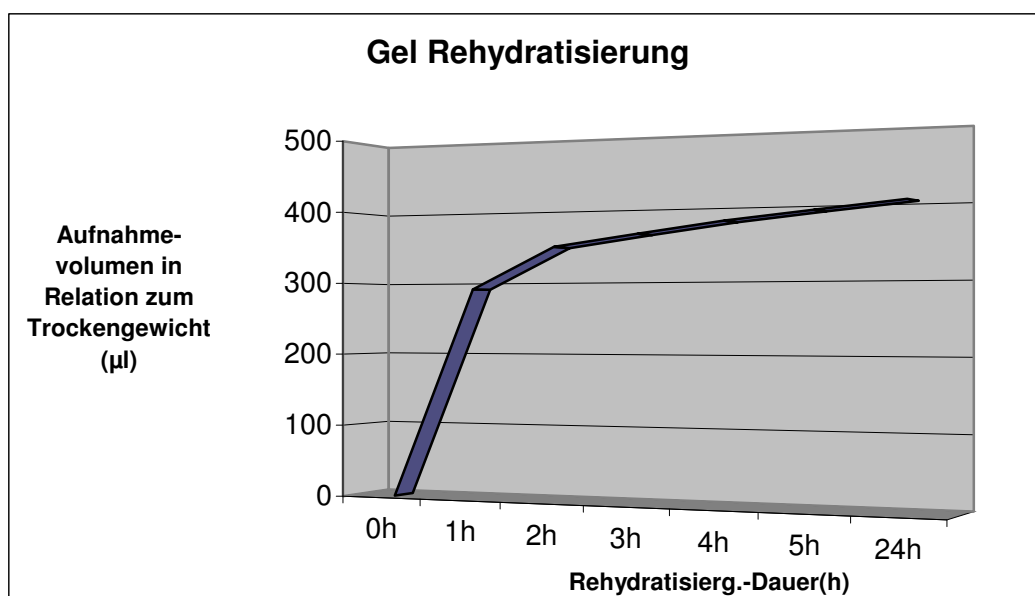
Zur Ermittlung des maximalen Aufnahmevolumens durch die IPG-Streifen wurden 6 IPG-Streifen (12 x 0,5 cm) in luftabgedichteten Pipetten in 400  $\mu$ l Rehydratisierungspuffer inkubiert. Die Inkubationszeit wurde dabei stufenweise von 1 h bis 5 h und im letzten Fall von 24 h gewählt. Die Streifen wurden vor und nach der Inkubation gewogen und unter Berücksichtigung des spezifischen Gewichtes des Rehydratisierungspuffers wurde das jeweilige Aufnahmevolumen ermittelt. Die Daten sind in der folgenden Tabelle 8 und Abbildung 9 zusammengestellt.

**Tabelle 8****Ermittlung des maximalen Aufnahmevolumens von 12-cm-IPG-Streifen**

6 IPG-Streifen wurden über 1, 2, 3, 4, 5 und 24 h in einem angebotenen Volumen von 400  $\mu$ l Pufferlösung rehydratisiert (weitere Einzelheiten siehe Text).

IPG-Streifen Nr.	1	2	3	4	5	6
Rehydratisierungszeit (h)	1	2	3	4	5	24
Trockengewicht ( $\mu$ g)	149	152	148	152	145	144
Gewicht nach Inkubation ( $\mu$ g)	472	545	548	580	565	572
Aufnahmevolumen <sup>a</sup> in Relation zum Trockengewicht ( $\mu$ l)	291	348	364	379	391	402

<sup>a</sup> Das Aufnahmevolumen wurde unter Berücksichtigung des spezifischen Gewichtes des Rehydratisierungspuffers errechnet.

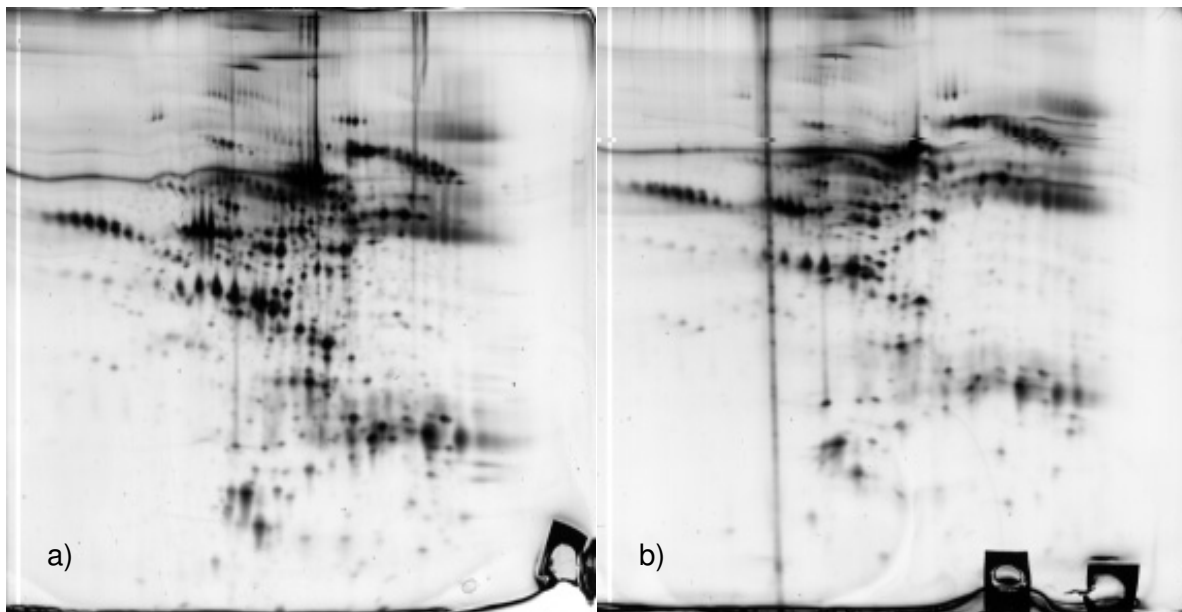
**Abbildung 9****Ermittlung des maximalen Aufnahmevolumens von 12-cm-IPG-Streifen**

siehe Legende zu Tabelle 6

Hierbei zeigte sich eine sich annähernde Sättigung der IPG-Streifen mit ca. 400  $\mu$ l Rehydratisierungspuffer nach ca. 4 h.

Um den Einfluss des Rehydratisierungspuffervolumens auf die elektrophoretische Trennung zu ermitteln, wurden 6 gleiche Fraktionen einer Serumprobe (je 5 µg Gesamtprotein) jeweils in 200 bzw. 400 µl Rehydratisierungspuffer eingebracht und anschließend einer 2D-Elektrophorese zugeführt.

Es zeigte sich, wie in Abbildung 10 dargestellt, dass ein höheres Volumen an Rehydratisierungspuffer (400 µl) zu einer schlechteren Probenaufnahme (weniger Spots) und auch unschärferen IEF führte. Somit verwendete ich im Weiteren die kleinere Menge an Rehydratisierungspuffer und folgte mit 225 µl auch einer Empfehlung von Berkelmann und Stenstedt [107].

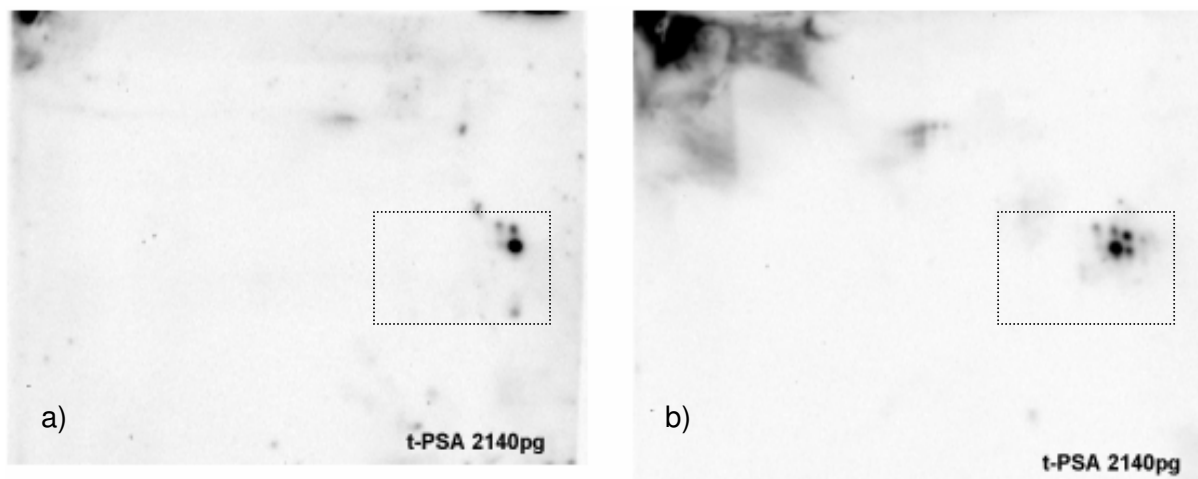


**Abbildung 10**  
2D-Elektrophorese einer Serumprobe (5 µg Gesamtprotein) in  
a) 200 µl bzw. b) 400 µl Rehydratisierungspuffer

Um den Einfluss von Thioharnstoff auf die elektrophoretische Trennung zu ermitteln [108], wurden jeweils 6 Proben einer Seminalplasmaverdünnungsreihe in Rehydratisierungspuffer mit bzw. ohne Thioharnstoff eingebracht und anschließend einer 2D-Elektrophorese und der anschließenden Detektion mittels Immunoblot zugeführt.

Die Proben 1 - 6 wurden in Rehydratisierungspuffer I (8 mol/l Harnstoff, 2 % CHAPS, 0,5 % IPG-Puffer, 20 mmol/l DTT), die Proben 7 - 12 wurden in Rehydratisierungspuffer II (8,3 mol/l Harnstoff, 2 mol/l Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2 % IPG-Puffer, 100 mmol/l DTT) gelöst.

Die im thioharnstoffhaltigen Rehydratisierungspuffer gelösten Proben ergaben sowohl ein stärkeres Signal als auch mehr Spots bei der Immundetektion. Beispielhaft verdeutlicht dies Abbildung 11.



**Abbildung 11**  
**2D-Elektrophorese und Immunoblot einer Seminalplasmaprobe (2,14 ng tPSA) mit verschiedenen Rehydratisierungspuffern:** a) ohne Thioharnstoff b) mit Thioharnstoff  
Der Markierte Bereich stellt die Region der fPSA-Subformen dar.

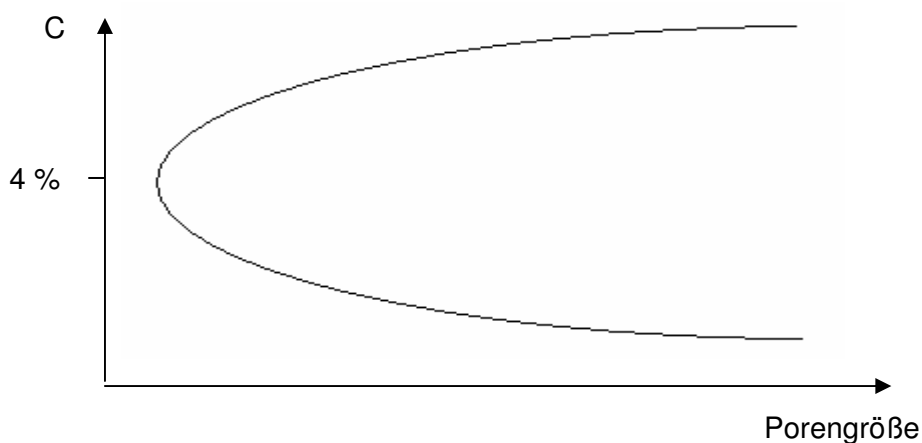


### 3.1.3.2 SDS-PAGE als 2.Dimension

Wie unter 2.2.2.2 beschrieben, werden in der 2. Dimension, der SDS-PAGE, die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

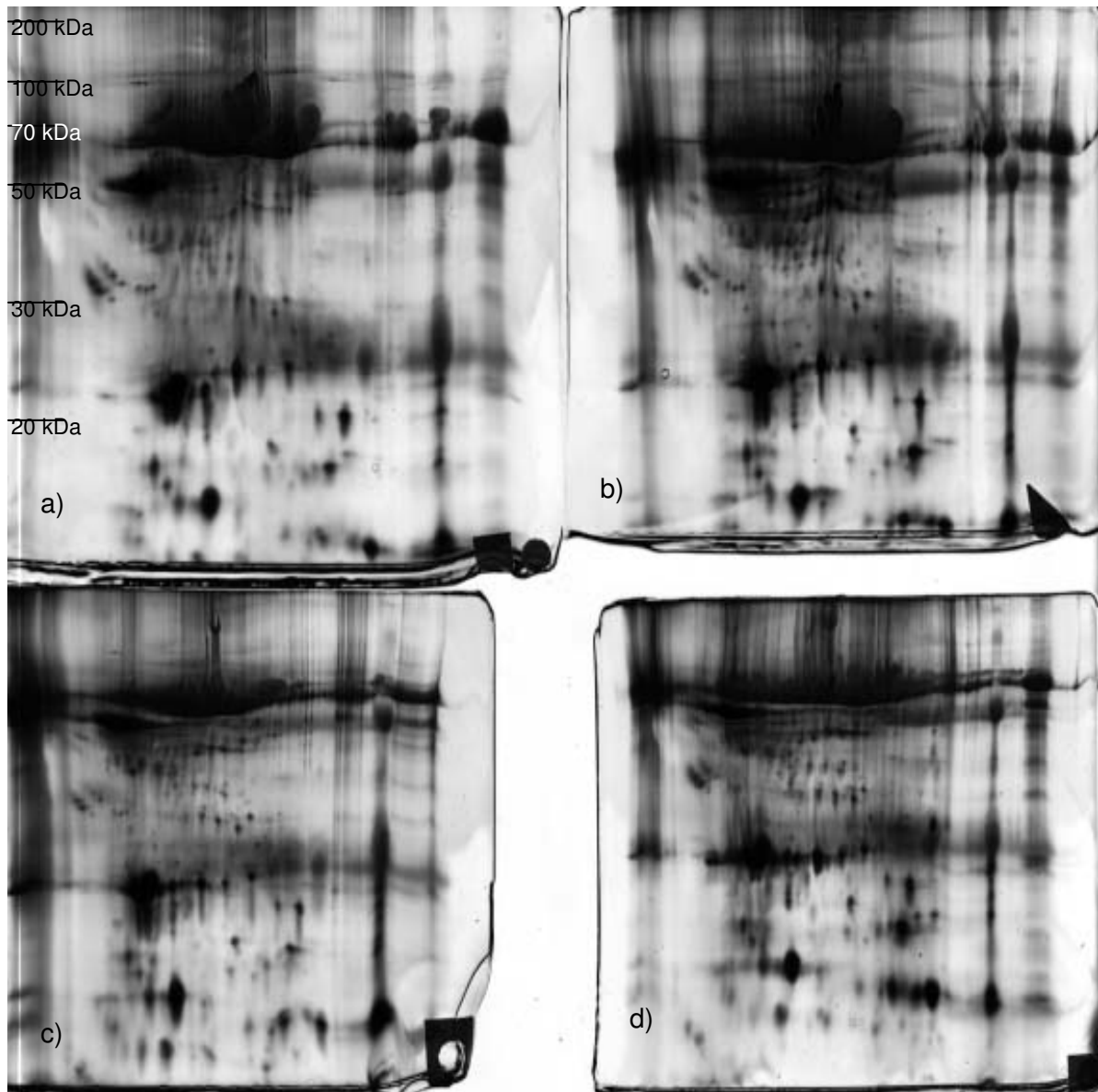
Nach Ausbildung der ellipsoiden SDS-Polypeptid-Mizellen ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungstrecken. Entsprechend hat die Porengröße der Gelmatrix entscheidenden Einfluss auf das Ergebnisbild.

Die Porengröße der Polyacrylamidgele lässt sich durch die Totalacrylamidkonzentration (T) und den Vernetzungsgrad C (Anteil Vernetzer an Totalacrylamidmasse) charakterisieren. Bei konstantem T und steigendem C folgt die Porengröße einer parabolischen Funktion: Bei hohen und niedrigen C-Werten erhält man große Poren. Das Minimum liegt bei C = 4 % (Gele mit C > 5 % sind relativ hydrophob und werden nur in Sonderfällen verwendet).



**Abbildung 12**  
**Parabolisches Verhältnis von Vernetzungsgrad (C) und Porengröße**

Daher wurden Gele mit Vernetzungsgraden von C = 0,5 / 1,0 / 1,5 / 2,0 % angefertigt und bei der 2D-Elektrophorese von 4 gleichen Fraktionen einer Serumprobe verwendet. Hierbei zeigte sich die größte Auftrennungstrecke der im Bereich von 25 – 70 kDa liegenden Proteine (und damit im weit gefassten Bereich des fPSA) im Gel mit dem Vernetzungsgrad C = 0,5 %.



**Abbildung 13**

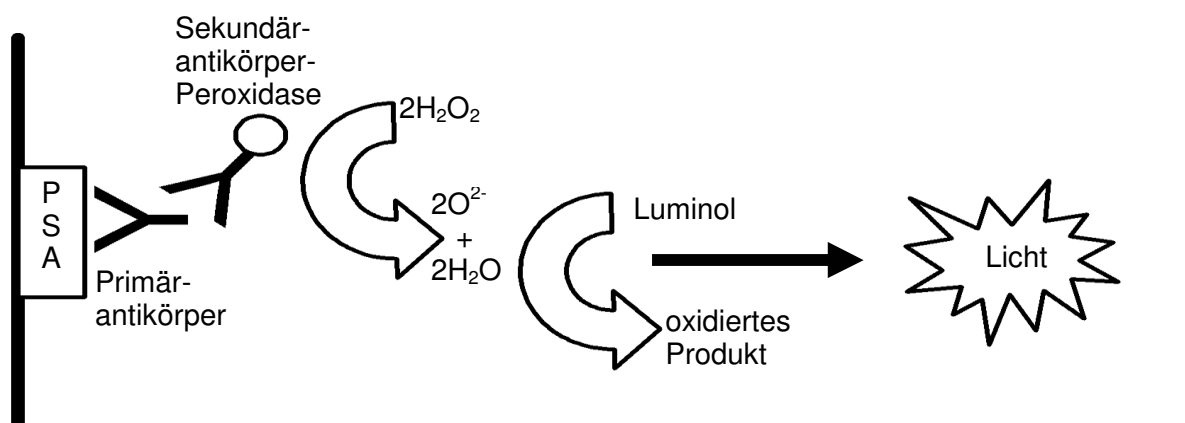
**2D-Elektrophorese und Silberfärbung von Serumproben (Gesamtprotein 50 µg) mit Gelen verschiedener Vernetzterkonzentrationen in der 2. Dimension**

a) C = 0,5 % b) C = 1,0 % c) C = 1,5 % d) C = 2,0 % bei konstantem T = 15%

### 3.1.4 Optimierung der Immundetektion

Nachdem die Proben die Immunsorption, die 2D-Elektrophorese und den Western-Blot durchlaufen hatten, stellte sich in der Goldfärbung der Blotmembranen noch immer ein komplexes Spotmuster dar. Eine spezifische, ausschließliche Darstellung von PSA-Isoformen war somit nicht möglich. Der immunologische Nachweis der getrennten Proteine als fPSA-Formen war deshalb notwendig.

Im ersten Schritt der Immundetektion bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das PSA, das entsprechend der elektrophoretischen Trennung auf der Blotmembran vorliegt. Im zweiten Schritt bindet ein POD-gekoppelter Sekundärantikörper an den primären Antigen-Antikörper-Komplex. Die eigentliche Detektion dieses Immunkomplexes findet peroxidasevermittelt durch ein luminogenes Substrat statt, das in ein elektronisch angeregtes, Photonen emittierendes Produkt umgewandelt wird. Diese Lichtreaktion lässt sich in einem speziellen Imager (CCD-Kamera) festhalten und mit entsprechender Software analysieren. In der Abbildung 14 habe ich das Schema der Immundetektion noch einmal zusammengefasst.



**Abbildung 14**  
**Schema der Reaktionskette bei der Immundetektion**

Die Spezifität der indirekten immunologischen Nachweismethode hängt weitestgehend von der Qualität des Primärantikörpers ab. Die Sensitivität ist abhängig vom Titer der Primär- und Sekundärantikörper und der Qualität (Empfindlichkeit und Verstärkereffekt) des Detektionssystems [109]

Entsprechend galt es, Folgendes festzulegen:

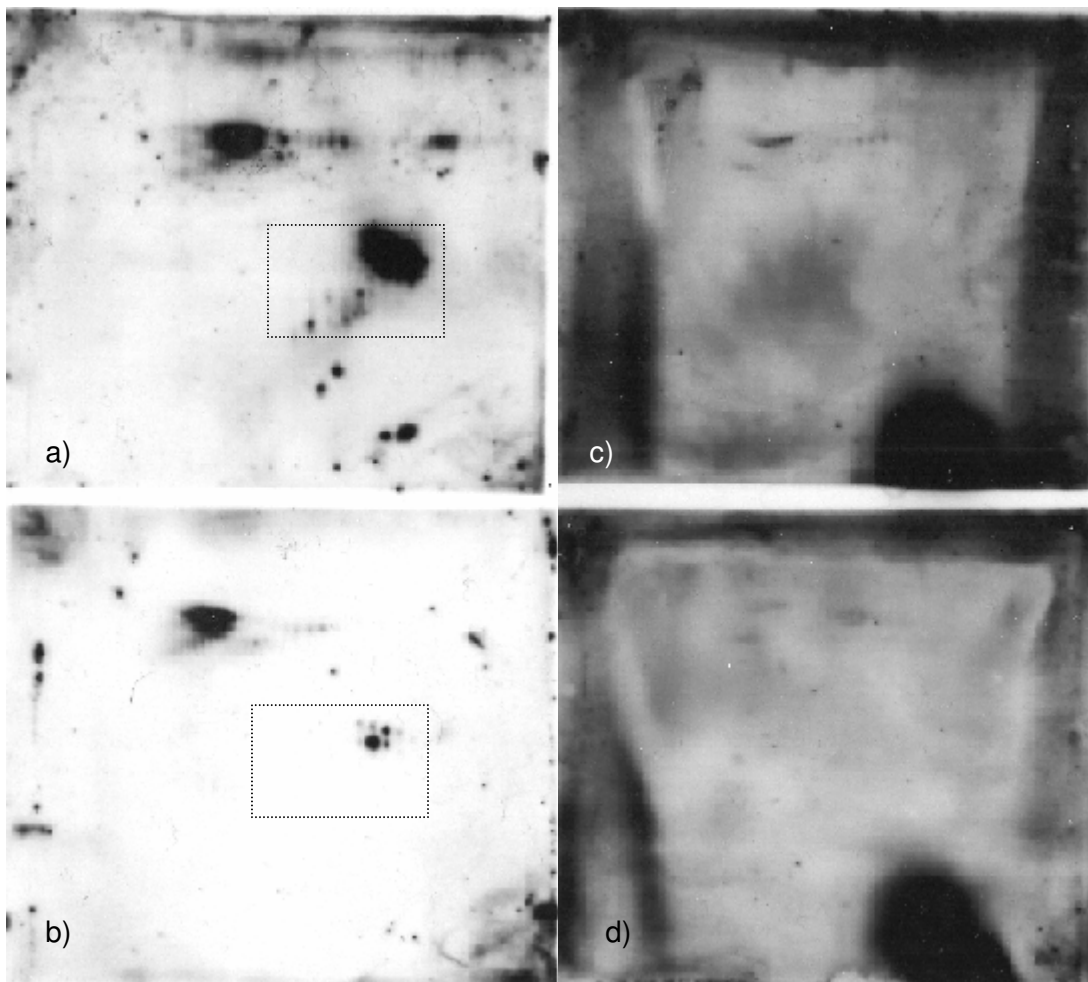
- den optimalen Primärantikörper,
- die optimalen Titer von Primär- und Sekundärantikörper und
- das optimale Detektionssystem

### 3.1.4.1 Wahl des Primärantikörpers

Zur Verfügung standen 3 Antikörper:

- 1. polyklonaler anti-tPSA (Kaninchen) von DAKO
- 2. monoklonaler anti-tPSA M36-Fab`Bi von Roche
- 3. monoklonaler anti-tPSA 13C9E9D6G8 (Maus) von BioMérieux

In einer ersten Gegenüberstellung wurden Seminalplasmaproben mit einer fPSA-Menge von 3,8 bzw. 0,38 ng einer 2D-Elektrophorese und einem Western-Blot zugeführt und anschließend mit jeweils zwei Blots eine Immundetektion mit den Primärantikörpern von DAKO bzw. Roche durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein passender Sekundärantikörper verwendet (POD-gekoppelter anti-Kaninchen-Ig (Ziege) von DAKO bzw. POD-gekoppeltes Streptavidin von Roche). Der polyklonale anti-tPSA von DAKO erwies sich als deutlich spezifischerer Primärantikörper, was aus den Abbildungen 15 a – d hervorgeht.



**Abbildung 15**

**Immunoblot von Seminalplasmaproben mit verschiedenen Primärantikörpern**

Getrennt wurden Proben mit 3,8 ng (a, c) bzw. 0,38 ng (b, d) fPSA.

Die Blots a, b wurden mit anti-tPSA von DAKO, die Blots c,d mit dem anti-tPSA M36-Fab`Bi von Roche entwickelt. (fPSA-Subformen markiert)

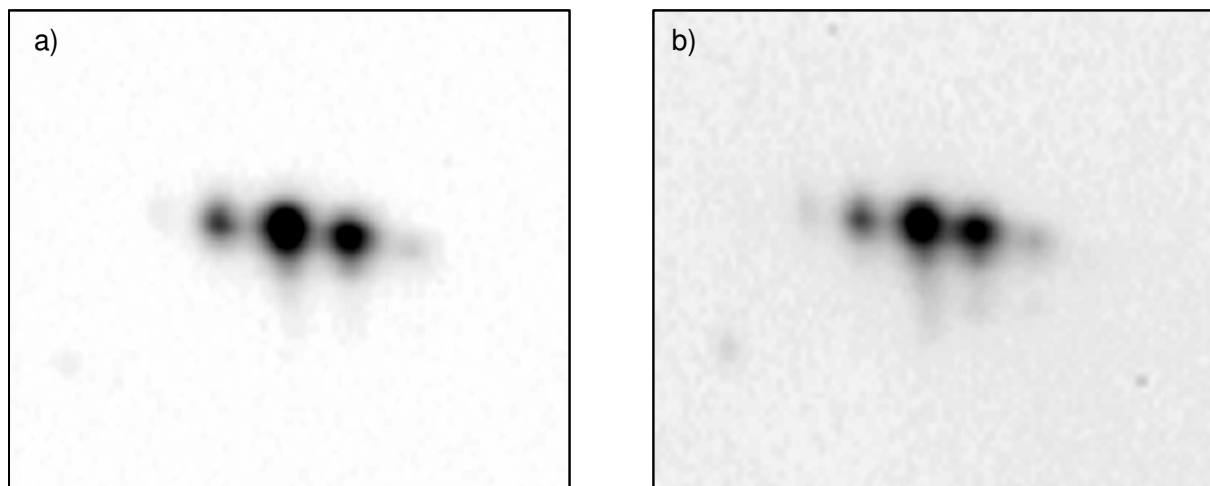
Um zu belegen, dass die erhaltenen Signale auch dem Primärantikörper zuzuschreiben sind, wurde für Seminalplasma-Proben nach Elektrophorese und Blotting eine Immundetektion mit 4 Protokollvarianten durchgeführt:

1. ohne Primärantikörper, mit Sekundärantikörper
2. mit Primärantikörper, ohne Sekundärantikörper,
3. ohne Primär- und ohne Sekundärantikörper sowie
4. mit beiden Antikörpern.

Einzig beim Gebrauch aller Komponenten zeigte sich das spezifische Signal. In den 3 anderen Fällen wurde kein Signal erhalten.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden Serumproben einer Immunsorption mit anti-fPSA, 2D-Elektrophorese und Western-Blot zugeführt und anschließend damit eine Immundetektion mit den Primärantikörpern von DAKO bzw. BioMérieux durchgeführt. Entsprechend wurde als Sekundärantikörper für BioMérieux ein anti-Maus-Ig (Ziege) verwendet.

Hier zeigte sich bei der Verwendung der DAKO-Antikörper ein ähnliches Muster, wie es mit BioMérieux-Antikörpern erhalten wurde (Abbildung 16). Da trotz mehrmaliger Anfrage keine weiteren Antikörper von BioMérieux zu beziehen waren, verwendeten wir im Weiteren DAKO-Antikörper.

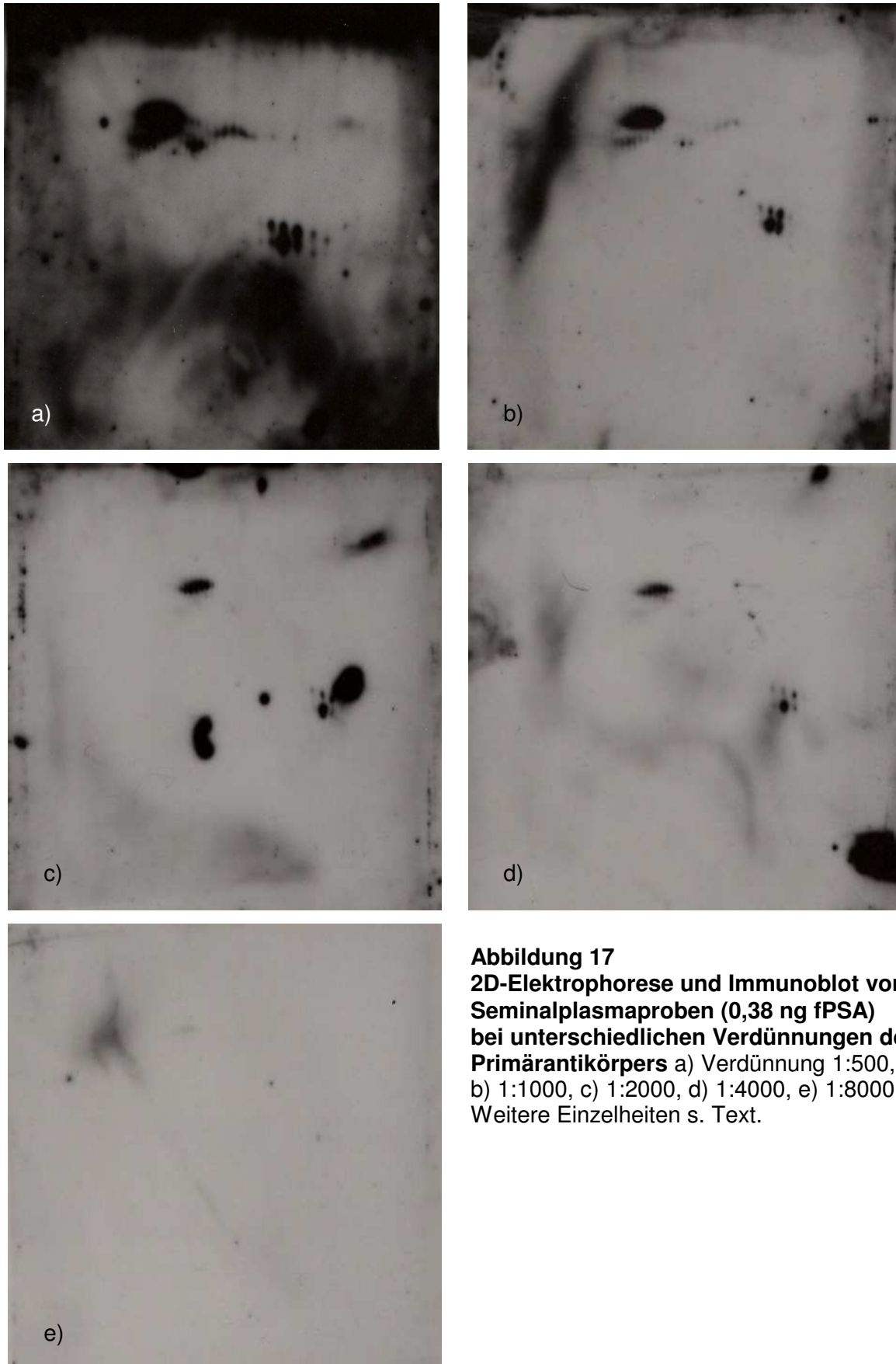


**Abbildung 16**  
**Immunoblot von Serumproben mit verschiedenen Primärantikörpern**  
mit a) polyklonalem anti-PSA von Dako b) monoklonalem anti-PSA von BioMérieux.

### **3.1.4.2 Optimierung des Primär- und Sekundärantikörpertiters**

Zur Austestung des optimalen Titers des Primärantikörpers für die Immundetektion wurden 5 Proben eines Seminalplasmapools (0,38 ng fPSA) einer 2D-Elektrophorese und dem Western-Blot zugeführt und anschließend damit eine Immundetektion mit den Antikörpern von DAKO durchgeführt. Bei gleich bleibendem Titer des Sekundärantikörpers von 1:2000 wurde eine Verdünnungsreihe des Primärantikörpers von 1:500 bis 1:8000 verwendet.

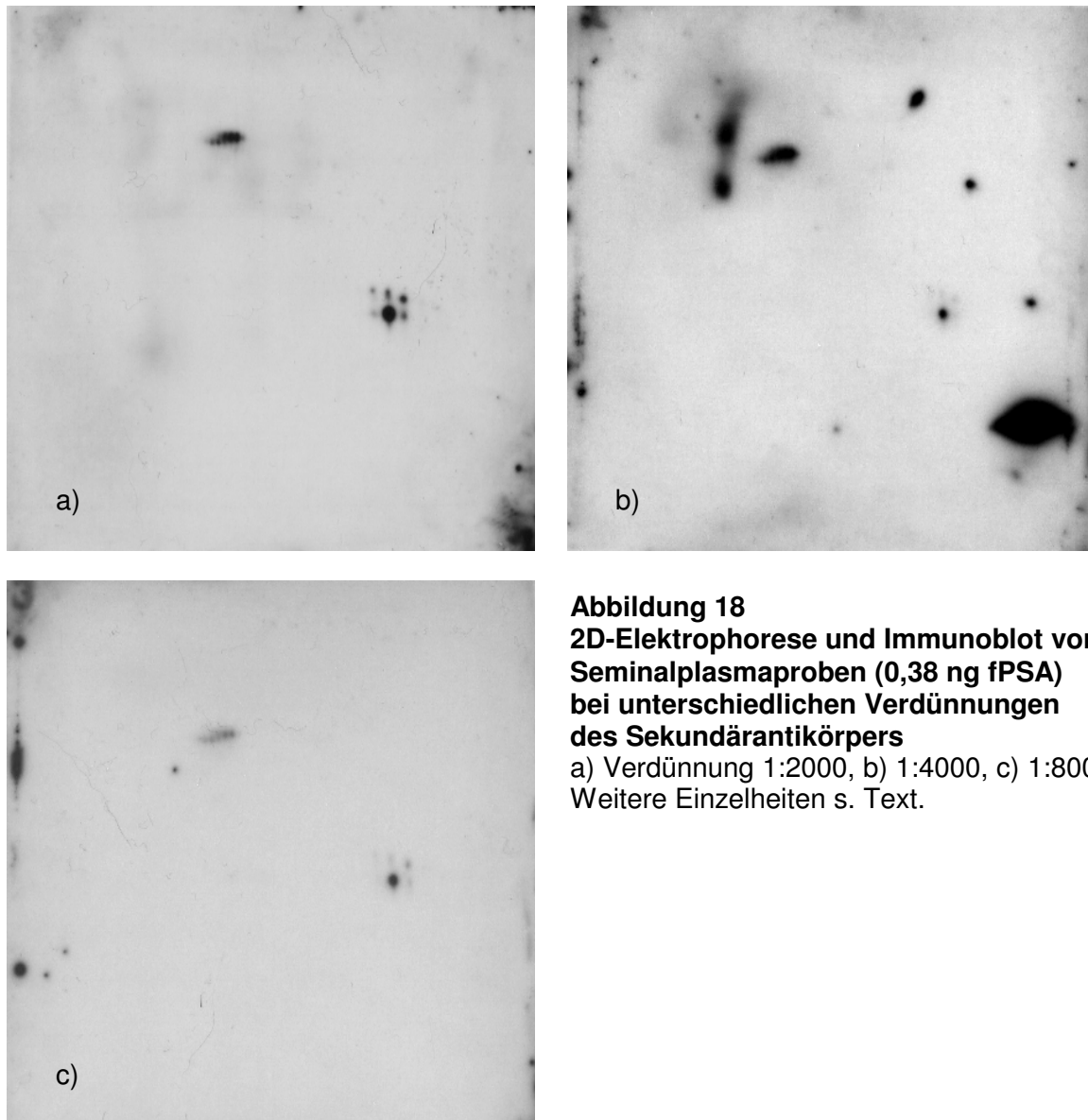
Das beste Signal-Hintergrund-Verhältnis ergab sich bei einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:2000. Das heißt, dies war die geringste Verdünnung die ein deutliches Signal bei geringstem Hintergrund erzeugte (s. Abbildung 17 c).



**Abbildung 17**  
**2D-Elektrophorese und Immunoblot von**  
**Seminalplasmaproben (0,38 ng fPSA)**  
**bei unterschiedlichen Verdünnungen des**  
**Primärantikörpers a) Verdünnung 1:500,**  
**b) 1:1000, c) 1:2000, d) 1:4000, e) 1:8000**  
Weitere Einzelheiten s. Text.

Zur Austestung des optimalen Titers des Sekundärantikörpers wurden 3 Proben eines Seminalplasmapools (0,38 ng fPSA) einer 2D-Elektrophorese und dem Western-Blot zugeführt und anschließend damit eine Immundetektion mit den Antikörpern von DAKO durchgeführt. Bei gleich bleibendem Titer des Primärantikörpers von 1:2000 wurde eine Verdünnungsreihe des Sekundärantikörpers von 1:2000 bis 1:8000 verwendet.

Die Verdünnung von 1:2000 ergab das beste Signal-Hintergrund-Verhältnis (s. Abbildung 18 a).



**Abbildung 18**  
**2D-Elektrophorese und Immunoblot von Seminalplasmaproben (0,38 ng fPSA) bei unterschiedlichen Verdünnungen des Sekundärantikörpers**  
a) Verdünnung 1:2000, b) 1:4000, c) 1:8000  
Weitere Einzelheiten s. Text.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde in den nachfolgenden Experimenten zur Immundetektion der fPSA-Subformen gleichermaßen der Primärantikörper wie auch der Sekundärantikörper von DAKO in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet.



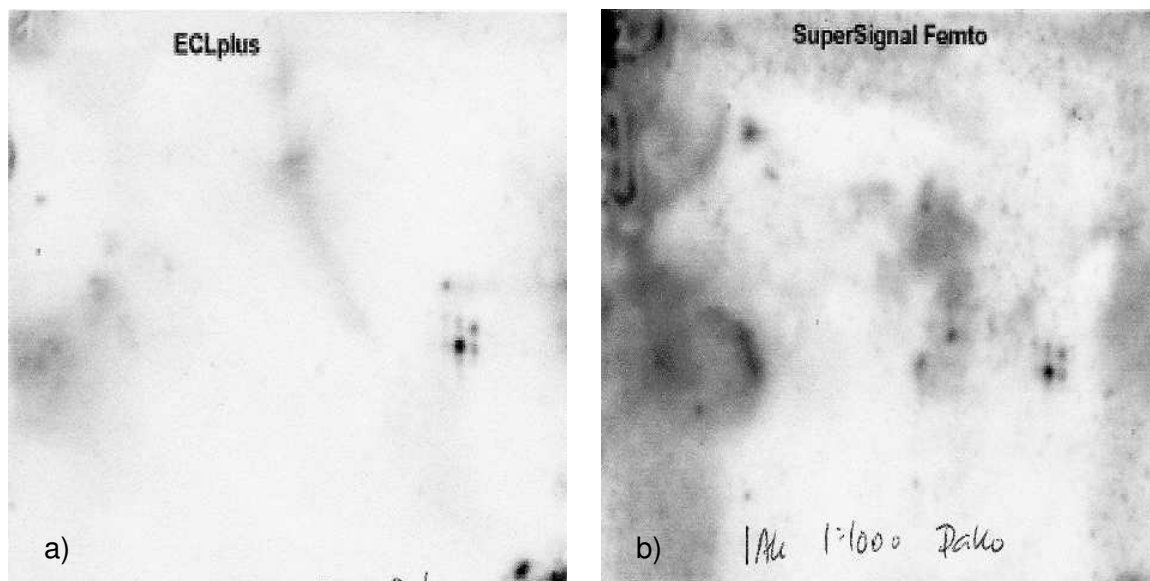
### 3.1.4.3 Wahl des Detektionssystems

Zur Detektion wurden 2 Systeme überprüft:

- ECL Plus von Amersham Pharmacia
- SuperSignal West Femto von Pierce

Um diese beiden Systeme zu bewerten, wurden Seminalplasmaproben (je 0,38 ng fPSA) einer 2D-Elektrophorese und dem Western-Blot zugeführt und anschließend damit eine Immundetektion durchgeführt. Die Detektion mit:

1. ECL Plus erfolgte mit einer Primärantikörperverdünnung von 1:2000 und einer Sekundärantikörperverdünnung von 1:2000
2. SuperSignal West Femto erfolgte mit einer vom Hersteller empfohlenen Primärantikörperverdünnung von 1:1000 und einer Sekundärantikörperverdünnung von 1:100.000



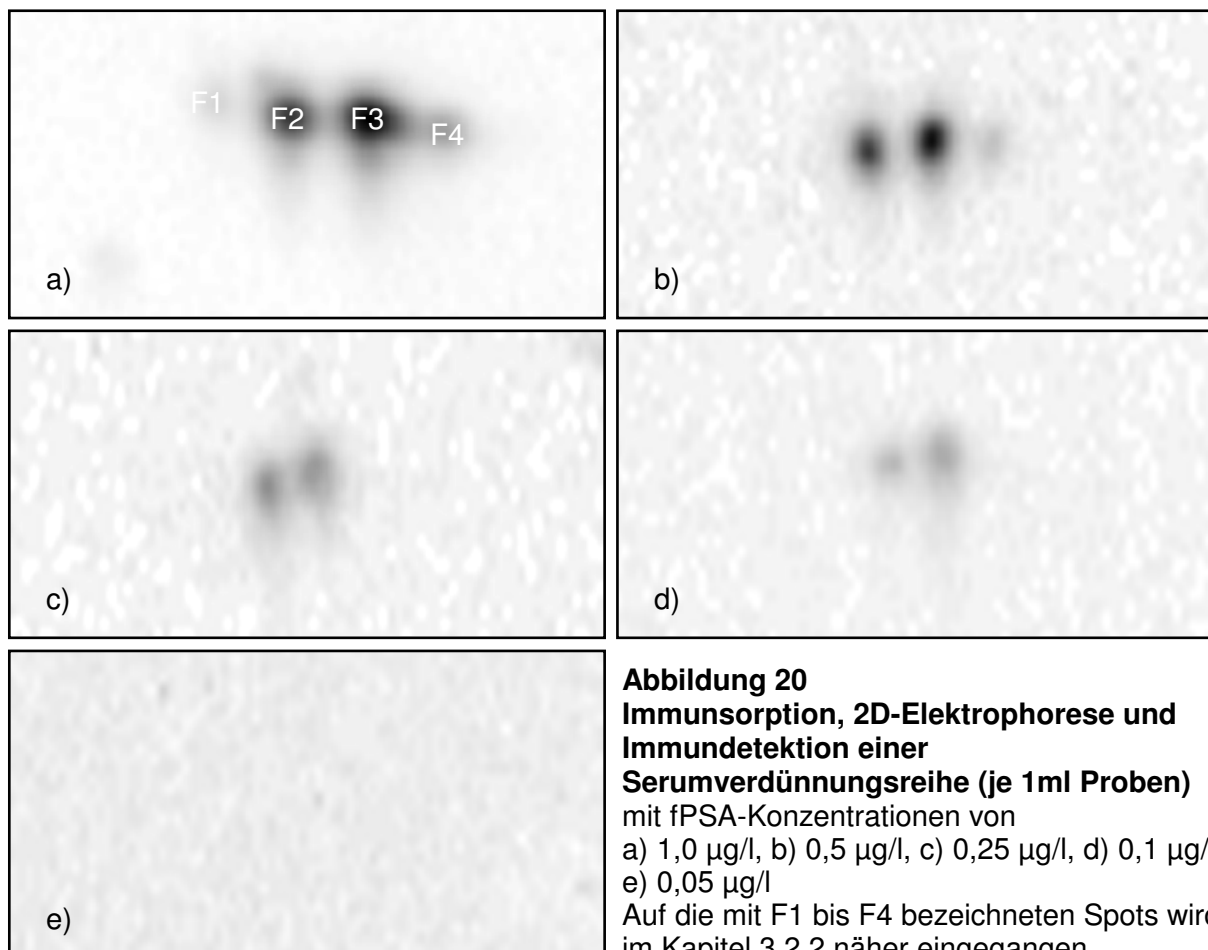
**Abbildung 19**  
**2D-Elektrophorese und Immunoblot von Seminalplasmaproben (0,38 ng fPSA)**  
**mit verschiedenen Detektionssystemen. a) ECL Plus b) SuperSignal West Femto**

Wie aus der Abbildung 19 a/b ersichtlich, zeigte sich kein Unterschied in der Sensitivität beider Detektionssysteme. Doch war der Hintergrund bei Verwendung von SuperSignal West Femto deutlich stärker. Auch nach Ermittlung des optimalen Titerverhältnisses von Primär- und Sekundärantikörper in Kombination mit diesem System ließ sich kein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis im Vergleich zum ECL Plus-System erreichen, sodass in den weiteren Versuchen ausschließlich ECL Plus eingesetzt wurde.

### 3.1.5 Bewertung der Methode

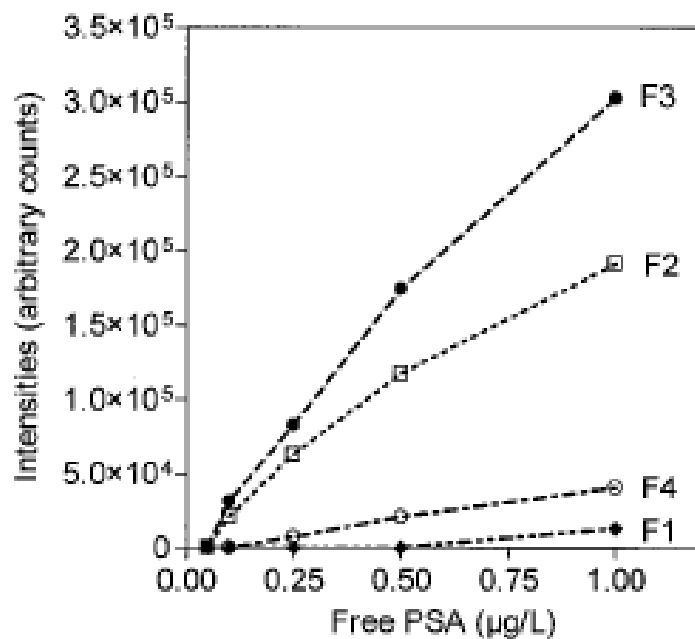
Mit der so optimierten Methode wurde nun ein erneuter Versuch zur Ermittlung der unteren Detektionsgrenze durchgeführt.

Dazu wurde eine Verdünnungsreihe aus einem Serumpool hergestellt. Dabei entstanden Proben mit einer fPSA-Konzentration von 0,05 bis 1,0  $\mu\text{g/l}$ . Bei der Verwendung von 1 ml Probenvolumen entsprach dies Proben mit fPSA-Mengen von 5 – 100 pg. Diese Proben wurden einer Immunsorption, 2D-Elektrophorese und anschließend einem Western-Blot zugeführt. Es zeigte sich, dass unterhalb einer fPSA-Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/l}$  bzw. einer fPSA-Menge von 10 pg mit der Immundetektion keine Spots mehr sichtbar gemacht werden konnten (Abbildung 20). Bei ursprünglich 3,8 ng fPSA Probenmenge als untere Detektionsgrenze (s. Kapitel 3.1.1) hat sich damit durch die Detektionsoptimierung eine Verbesserung um das 380-Fache erreichen lassen.



**Abbildung 20**  
**Immunsorption, 2D-Elektrophorese und**  
**Immundetektion einer**  
**Serumverdünnungsreihe (je 1ml Proben)**  
 mit fPSA-Konzentrationen von  
 a) 1,0  $\mu\text{g/l}$ , b) 0,5  $\mu\text{g/l}$ , c) 0,25  $\mu\text{g/l}$ , d) 0,1  $\mu\text{g/l}$ ,  
 e) 0,05  $\mu\text{g/l}$   
 Auf die mit F1 bis F4 bezeichneten Spots wird  
 im Kapitel 3.2.2 näher eingegangen.

Mit diesem Versuch lässt sich ebenso die Linearität der Immunsorption bestätigen. Misst man die Signalintensität der Spots F1, F2, F3, F4 und setzt die Summe, unter der Annahme, sie repräsentiere die fPSA-Konzentration, in Relation zur gemessenen fPSA-Konzentration bei der Herstellung der Verdünnungsreihe (also die Serumkonzentration vor der Immunsorption), so ergibt sich eine Wiederfindung von 93,7 % mit einer Standardabweichung von 11,3 % (s. auch Abbildung 21).



**Abbildung 21**

**Sensitivität und Linearität der optimierten Methode (Immunsorption, 2D-Elektrophorese und Immunoblot) zur Detektion von fPSA-Subformen**

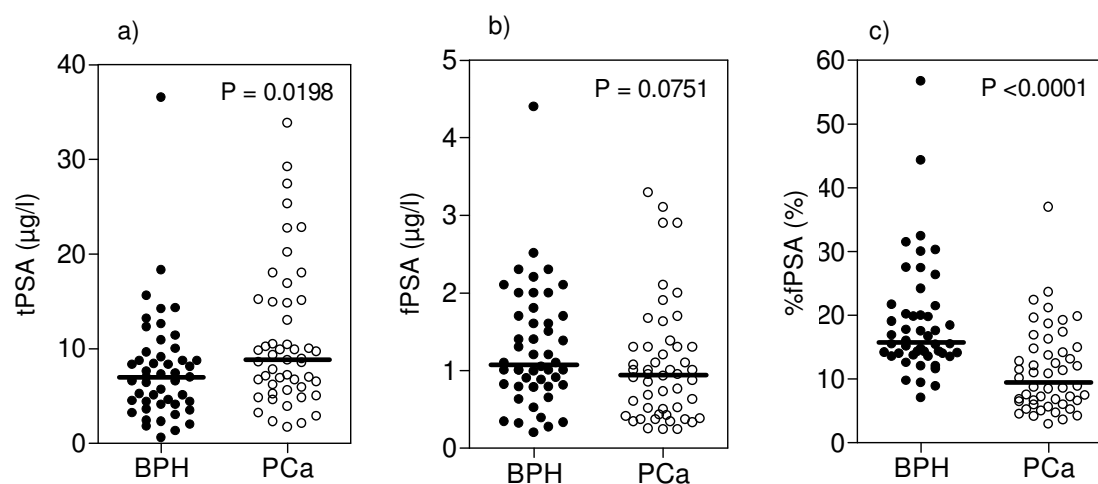
Darstellung von Signalintensitäten der Spots F1 – F4 in Relation zu ursprünglich gemessenen fPSA-Konzentrationen einer Serumverdünnungsreihe.

Die Präzision der gesamten Methode wurde durch 10-maliges Wiederholen von Immunsorption, 2D-Elektrophorese, Western-Blot und Immundetektion mit einer Serumprobe ermittelt. Dabei wurden jeweils die Signalintensitäten der Spots F2 und F3 gemessen. Der Quotient aus F2 und F3 in Prozent ausgedrückt ergab 59,1 % mit einer Standardabweichung von 10,1 %.

### 3.2 Erste Untersuchungsergebnisse zur klinischen Validität der Trennung von fPSA-Subformen

#### 3.2.1 Charakterisierung der untersuchten Patienten hinsichtlich PSA und Tumorklassifikation

Wie schon erwähnt, wurden jeweils 50 Serumproben von BPH- bzw. PCa-Patienten untersucht. In der Gruppe der PCa-Patienten befanden sich 32 Patienten mit tPSA-Werten von 2 - 10 µg/l, 25 Patienten mit Werten von 4 - 10 µg/l, 11 Patienten mit Werten von 10 - 20 µg/l und 7 Patienten mit Werten > 20µg/l. In der Gruppe der BPH-Patienten befanden sich 38 Patienten mit tPSA-Werten von 2 - 10 µg/l, 29 Patienten mit Werten von 4 - 10 µg/l, 9 Patienten mit Werten von 10 - 20 µg/l und 1 Patient mit einem Wert von >20µg/l. Das jeweilige Verteilungsmuster von tPSA, fPSA und %fPSA-Werten innerhalb der beiden Gruppen wird in Abbildung 22 dargestellt.



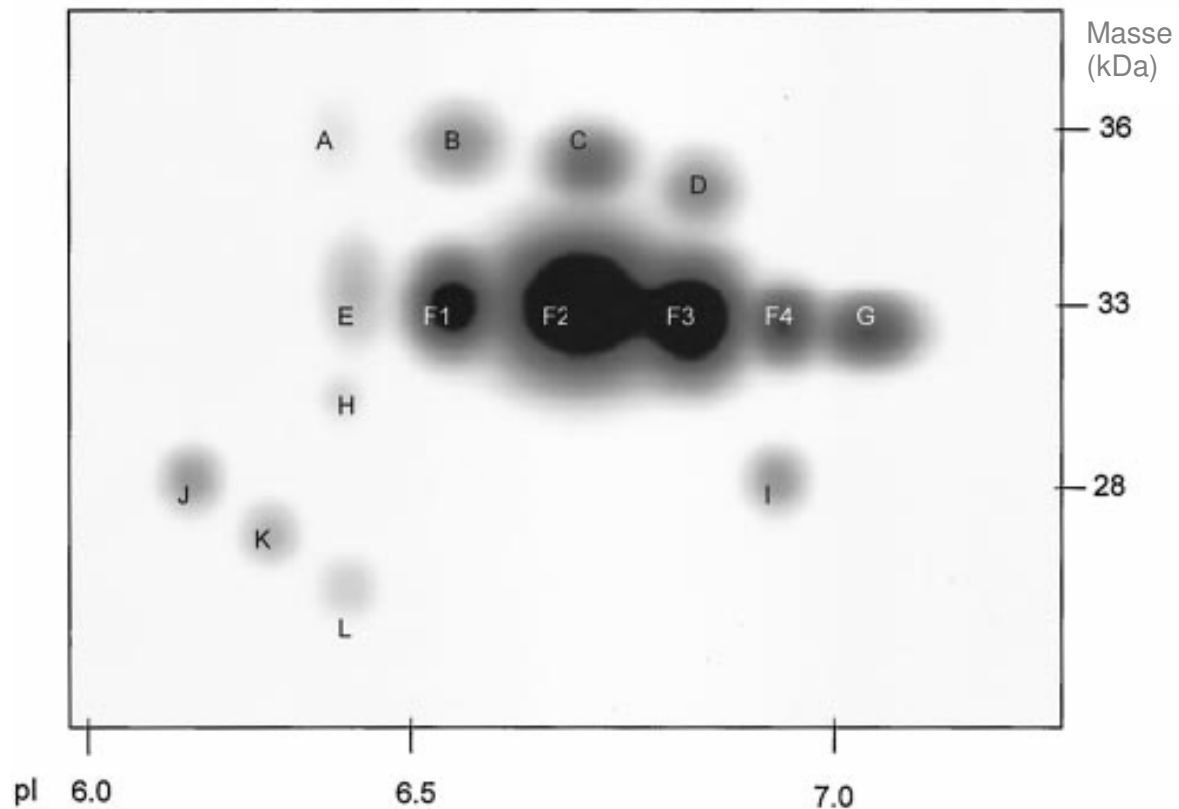
**Abbildung 22**

**Verteilungsmuster von a) tPSA, b) fPSA und c) %fPSA innerhalb der Gruppe von BPH- und PCa-Patienten.** Die statistischen Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney U-Test errechnet.

Die Tumorstadien in der Gruppe der PCa-Patienten verteilten sich entsprechend der TNM-Klassifikation [110] wie folgt: 6 Patienten hatten ein Tumorstadium von pT1 oder T1, bei 27 Patienten lagen die Stadien pT2 / T2 vor, 14 Patienten hatten pT3 / T3 jeweils ohne Metastasen, 2 Patienten hatten T3pN1M0, und 1 Patient hatte T3NxM1. Der Tumorgrad war entsprechend des Gleason-Systems [111] bei 32 Patienten  $\leq 7$ , bei 16 Patienten  $> 7$  (bei 2 Patienten waren keine Gleason-Werte zu ermitteln).

### 3.2.2 Qualitative Daten der fPSA-Subformen

Die Auswertung der 50 BPH- und PCa-Seren ergab unter Zusammenfassung aller detektierten Spots eine Anzahl von mindestens 15 immunreaktiven Spots. Diese erhielten willkürlich gewählte Bezeichnungen aus Buchstaben bzw. Kombinationen von Buchstaben und Zahlen:



#### Abbildung 23

#### Zusammenfassung und Bezeichnung aller gefundenen fPSA Fraktionen

(aus der Gesamtheit der untersuchten Proben)

Eine Übersicht über das Vorkommen dieser Spots ist in Tabelle 9 zusammengestellt. Einzig die Spots F2 und F3, charakterisiert durch ein Molekulargewicht von 33 kDa und isoelektrische Punkte zwischen pH 6,6 und pH 6,8, traten in allen untersuchten Proben auf. Die Spots A - D, charakterisiert durch ein höheres Molekulargewicht von 35 bis 36 kDa traten ausschließlich bei PCa-Proben auf. Auch die Spots E, G, H, I, K, L traten vereinzelt aber ausschließlich bei PCa-Proben auf.

**Tabelle 9****Übersicht über das Auftreten der verschiedenen fPSA-Subformen in Seren der untersuchten 50 BPH- und 50 PCa-Patienten.**

n bzw. % gibt die Anzahl der Patienten bzw. den Prozentanteil in der jeweiligen Patientengruppe an, bei denen die Spots A – L nachgewiesen wurden.

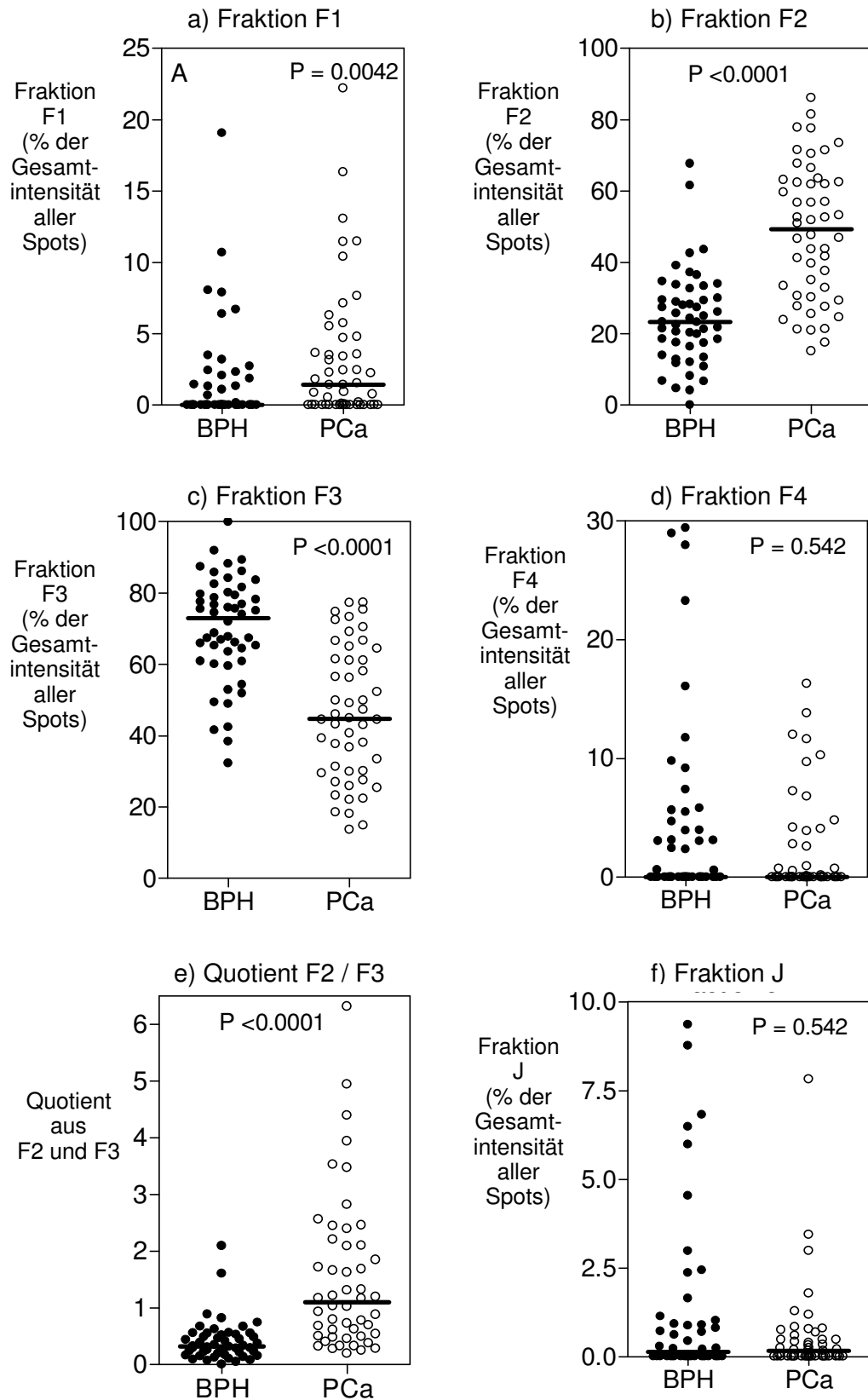
Spot	BPH-Proben		PCa-Proben		P-Wert <sup>a</sup>
	n	(%)	n	(%)	
A	0	(0)	3	(6)	0,242
B	0	(0)	4	(8)	0,118
C	0	(0)	4	(8)	0,118
D	1	(2)	3	(6)	0,617
E	0	(0)	6	(10)	0,027
F1	20	(40)	32	(64)	0,027
F2	50	(100)	50	(100)	1,000
F3	50	(100)	50	(100)	1,000
F4	23	(46)	29	(58)	0,318
G	0	(0)	7	(14)	0,013
H	0	(0)	1	(2)	1,000
I	0	(0)	3	(6)	0,118
J	36	(72)	38	(76)	0,819
K	0	(0)	3	(6)	0,242
L	0	(0)	1	(2)	1,000

<sup>a</sup> P-Wert berechnet nach dem Fisher-Exakt-Test als Ausdruck des Unterschieds im Vorkommen der einzelnen fPSA-Subformen zwischen den beiden Patientengruppen.

**3.2.3 Quantitative Daten der fPSA-Subformen**

Die fünf am häufigsten vorkommenden Spots F1, F2, F3, F4 und J machen fast 100 % der gesamten Signalintensität aus und stellen damit die Hauptsubformen des fPSA im Serum dar. Davon nehmen die Spots F2 und F3 bereits 95 % ein. In 75 % aller Fälle umfassen die Spots F1, F4 und J etwa 5 %.

Abbildung 24 stellt die Signalintensität der fünf fPSA Fraktionen F1, F2, F3, F4 und J in prozentualer Relation zur Gesamtsignalintensität der Einzelprobe jeweils im Vergleich zwischen BPH- und PCa-Patientenserum dar.



**Abbildung 24**  
 fPSA-Subformen a) F1, b) F2, c) F3, d) F4, f) J und e) Quotient aus F2 und F3 in BPH- und PCa-Patientenseren. Die Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney U-Test errechnet.

Auffällig ist dabei das gegensätzliche Verhalten der F2- und F3-Fraktion. So ist F2 in der Gruppe der BPH-Patienten (Mittel: 23 %; Variationsbreite: 3 – 68 %) niedriger als bei PCa-Patienten (Mittel: 49 %; Variationsbreite: 15 – 86 %) und F3 deutlich höher bei BPH-Patienten (Mittel: 73 %; Variationsbreite: 32 – 99 %) als bei PCa-Patienten (Mittel: 45 %; Variationsbreite: 14 – 77 %). Daher bietet sich die Bildung eines Quotienten aus F2 und F3 an. Dieser ist im Falle der PCa-Patienten (Mittel: 1,01; Variationsbreite: 0,20 – 6,31) um das 3fache höher als bei BPH-Patienten (Mittel: 0,32; Variationsbreite: 0,03 – 2,0).

### 3.2.4 Verhältnis zu pathologischen Daten

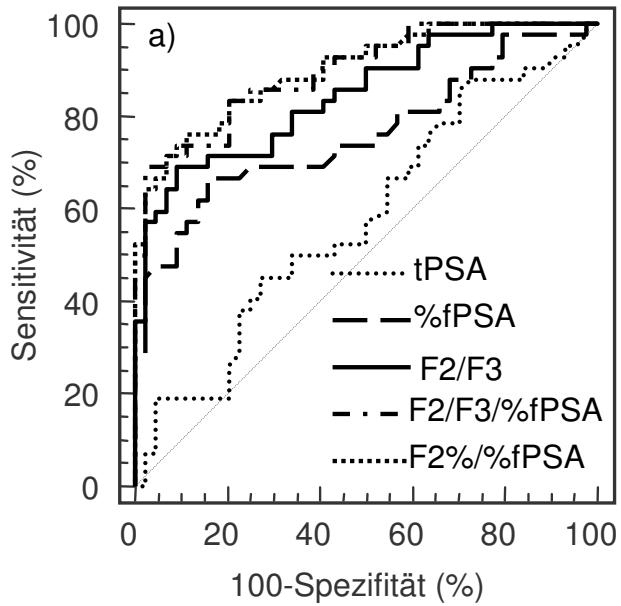
Weder die prozentualen Anteile von F2, F3 noch der Quotient F2 / F3 korrelierten mit dem Tumorstadium nach Gleason. Zwischen der Tumorklassifikation (T1 – T3) und dem Quotienten F2 / F3 ergab sich eine Korrelation von  $r_s = 0,346$  und  $P = 0,016$ .

### 3.2.5 Diagnostische Relevanz

Für alle Patienten mit einem tPSA von 2 bis 20  $\mu\text{g/l}$  wurden ROC-Analysen durchgeführt (Abbildung 25, Tabelle 10). Dabei ergaben die absoluten und prozentualen Werte von F2 und F3 sowie die Quotienten aus F2 und F3, F2 und fPSA oder %fPSA und F2 / F3 und %fPSA höhere Werte als tPSA. Verglichen mit %fPSA war eine Tendenz zu deutlich höheren Werten mit den Quotienten aus F2 und %fPSA sowie aus F2 / F3 und %fPSA zu verzeichnen.

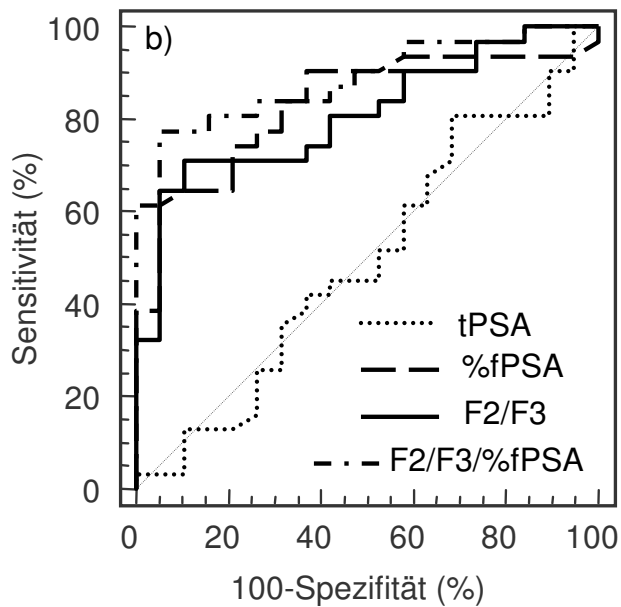
Unterteilte man die Patientengruppe in eine Gruppe mit %fPSA-Werten über und eine mit %fPSA-Werten unter 15 %, so wurde die Differenz noch augenscheinlicher. In der ersten Gruppe boten die Quotienten aus F2 und F3 sowie F2 / F3 und %fPSA eine signifikant bessere Differenzierungsmöglichkeit zwischen BPH und PCa, wohingegen tPSA und %fPSA hier keine Differenzierung ermöglichten.



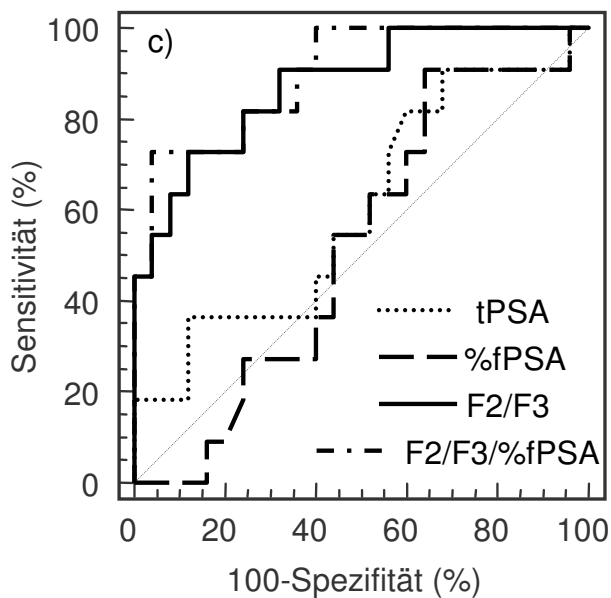


**Abbildung 25**  
**ROC-Kurven für tPSA,**  
**%fPSA und Derivate der**  
**fPSA-Subformen.**

**a)** ROC-Analyse für 49 BPH und 43 PCa Patienten mit einem tPSA von 2 – 20 µg/l mit AUC in Tabelle 10 wiedergegeben.



**b)** ROC-Analyse für 19 BPH und 31 PCa Patienten mit einem tPSA von 2 – 20 µg/l und %fPSA von < 15 %



**c)** ROC-Analyse für 25 BPH und 11 PCa Patienten mit einem tPSA von 2 – 20 µg/l und %fPSA von > 15 %

Tabelle 10

Flächen unter den ROC-Kurven der fPSA-Subformen und ihre Quotienten im Vergleich zu denen von tPSA und %fPSA in einem Bereich von tPSA von 2 bis 20 µg/l.<sup>a</sup>

Variablen	AUC (95% CI)	P -Werte, paarweiser Vergleich von AUCs der verschiedenen Variablen mit den AUC von	
		tPSA	%fPSA
tPSA	0,580 (0,468 - 0,685)		0,008
fPSA	0,667 (0,557 - 0,765)	0,110	0,104
%fPSA	0,762 (0,658 - 0,847)	0,008	
<b>fPSA-Subformen<sup>b</sup></b>			
J	0,563 (0,452 - 0,670)	0,828	0,009
J%	0,530 (0,420 - 0,639)	0,522	0,003
F1	0,648 (0,546 - 0,741)	0,532	0,090
F1%	0,629 (0,518 - 7,30)	0,373	0,145
F2	0,799 (0,698 - 0,877)	0,004	0,596
F2%	0,854 (0,761 - 0,921)	<0,0001	0,154
F3	0,793 (0,692 - 0,873)	0,003	0,639
F3%	0,826 (0,729 - 0,899)	<0,0001	0,310
F4	0,575 (0,463 - 0,681)	0,938	0,007
F4%	0,556 (0,445 - 0,663)	0,730	0,003
<b>Quotienten</b>			
F2/F3	0,846 (0,752 - 0,915)	<0,0001	0,195
(F2/F3)*F1	0,742 (0,637 - 0,831)	0,037	0,791
<b>%fPSA und Subformen</b>			
F2/fPSA	0,790 (0,689 - 0,870)	0,001	0,630
F3/fPSA	0,572 (0,461 - 0,678)	0,905	0,243
F2/%fPSA	0,864 (0,773 - 0,928)	<0,0001	0,015
F3/%fPSA	0,510 (0,400 - 0,620)	0,362	0,005
(F2/F3)/%fPSA	0,887 (0,812 - 0,952)	<0,0001	0,004
(F2/F3)*F1/%fPSA	0,774 (0,671 - 0,857)	0,011	0,857
(F2+F3)/%fPSA	0,725 (0,618 - 0,816)	0,048	0,243

<sup>a</sup>Diese Untergruppenanalyse beinhaltet 43 PCa und 49 BPH Patienten.

<sup>b</sup>fPSA-Subformen in %, entsprechend dem prozentualen Anteil der jeweiligen Fraktion an der Summe der Fraktionen J, F1, F2, F3, und F4 die als 100 % gesetzt wird.

Die Sensitivität und Spezifität der Subformen F2 und F3 und deren Quotienten, verglichen mit Sensitivität und Spezifität von tPSA und %fPSA werden in Tabelle 11 dargestellt. Betrachtet wurde hier die Gruppe von 49 BPH und 43 PCa Patienten mit einem tPSA von 2 - 20 µg/l. Die Angaben wurden jeweils für eine Spezifität bzw. Sensitivität von 90 % errechnet. Dabei zeigte sich im Vergleich zu %fPSA eine signifikant bessere Sensitivität und Spezifität für den Quotienten F2 / F3, F2 / %fPSA, %F2 / %fPSA, und (F2 / F3) / %fPSA.

**Tabelle 11**  
**Diagnostische Sensitivität und Spezifität von tPSA, %fPSA und den Quotienten der fPSA-Subformen F2 und F3 bei 90 % Sensitivität bzw. Spezifität <sup>a</sup>.**

	Sensitivität in % (95% Konfidenzintervall)	Spezifität in % (95% Konfidenzintervall)
tPSA, µg/l		
3,2	90 (77–97)	11 (3,8–25)
13,2	19 (8,6–34)	90 (77–99)
%fPSA		
19,9	90 (77–99)	27 (15–43)
11,0	55 (39–70)	90 (77–99)
F2/F3		
0,28	90 (77–99)	39 (24–55)
0,67	69 (53–82)	90 (77–99)
F2 / %fPSA		
13 696	90 (77–99)	52 (37–68)
24 942	67 (51–80)	90 (77–99)
%F2 / %fPSA		
1,61	90 (77–99)	59 (43–74)
2,49	74 (58–86)	90 (77–99)
(F2 / F3) / %fPSA		
0,0238	90 (77–99)	57 (41–72)
0,0458	71 (55–84)	90 (77–99)

<sup>a</sup> Daten aus der ROC-Analyse von 49 BPH- und 43 PCa- Seren (tPSA von 2–20 µg/l).

Die Ergebnisse wurden mittels logistischer Regressionsanalyse überprüft. Daraus ergab sich, dass ausgehend von einer insgesamt korrekten Diagnoserate betreffend BPH oder PCa von 60,2 % durch die alleinige Messung von tPSA ein Fortschritt hin zu 66,7 % durch %fPSA, durch den Quotienten  $F2 / F3$  eine Verbesserung hin zu 76,3 % und durch den Quotienten  $(F2 / F3) / \%fPSA$  sogar hin zu 80,6 % erreicht wird. In der Multivariatenanalyse aller vier Variablen erwies sich nur der Quotient  $(F2 / F3) / \%fPSA$  mit einer insgesamt korrekten Diagnoserate von 80,6 % als unabhängige Variable zur Differenzierung.

## 4 Diskussion

Entsprechend der Darstellung der Ergebnisse habe ich auch die Diskussion in zwei Abschnitte unterteilt. Zunächst werde ich die von mir optimierte Methodik den Verfahren anderer Arbeitsgruppen gegenüberstellen, die eine ähnliche Aufgabenstellung bearbeitet haben. In einem Zweiten Abschnitt vergleiche ich die durch Anwendung meiner Methodik auf BPH- und PCa-Seren erhaltenen Daten und daraus resultierende erste klinische Ergebnisse mit dem aktuellen Erkenntnisstand.

### 4.2 Diskussion der Methodik

Mit dem Ziel, fPSA-Subformen aus dem Serum darzustellen und damit eine bessere Differenzierung zwischen PCa und BPH vor allem im Bereich von 2 – 20 µg/l tPSA zu erreichen, wählte ich die 2D-Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine. Dabei werden die Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Die niedrige Konzentration des fPSA im Serum ist eine analytische Herausforderung und stellte anfangs ein Problem dar, da das Detektionsverfahren bei Seren mit einem tPSA von 2 - 20 µg/l, das heißt dem klinisch relevanten Bereich, nicht ausreichend sensitiv für eine direkte Detektion von fPSA war. Vor allem jedoch war das maximal einsetzbare Probenvolumen für die 2D-Elektrophorese von etwa 1,5 µl durch den weit überwiegenden Anteil an Nicht-PSA-Proteinen im Serum deutlich eingeschränkt. Setzte man ein höheres Probenvolumen ein, wurde die elektrophoretische Auftrennung durch massive Proteinüberladung zunehmend unscharf (s. Kapitel 3.1.1). Diese ersten Versuche zeigten, dass zwei miteinander verbundene Probleme zu lösen waren. Es galt die großen Mengen an Fremdproteinen zu eliminieren und die Empfindlichkeit des fPSA-Nachweises zu erhöhen. Die alleinige Entfernung von Albumin und Immunglobulinen mittels Cibacron Blue war bei einer Reduktion der Gesamtproteinkonzentration auf 20 % noch nicht zufrieden stellend. Statt die Fremdproteine aus dem Serum zu entfernen, extrahierte ich daher die PSA-Fraktion aus dem Serum.

Durch die Aufreinigung von PSA aus dem Serum mittels direkter Immunsorption konnte das eingesetzte Probenvolumen theoretisch unbegrenzt hoch sein. Praktisch beschränkte ich mich aufgrund der Verfügbarkeit auf 1 ml Serum, was über das 650fache des ursprünglich maximalen Volumens darstellt. Die Vollständigkeit der spezifischen Extraktion von PSA aus dem Serum konnte durch tPSA- bzw. fPSA-Bestimmung vor und nach der Immunsorption auf > 97 % beziffert werden (s. Kapitel 3.1.2.2). Somit ist von einem zu vernachlässigenden Verlust an fPSA-Subformen auszugehen.

Durch Optimierung von 2D-Elektrophorese und Immunoblotting konnte die untere Detektionsgrenze von ursprünglich 3,8 ng auf 10 pg fPSA Probenmenge herabgesenkt werden (s. Kapitel 3.1.6). Damit war ich schließlich in der Lage, die Heterogenität des fPSA mit mindestens 15 verschiedenen Spots deutlich darzustellen.

Bisher liegen wenige Arbeiten zur 2D-Elektrophorese des PSA vor. Sicherlich liegt das an den auch in dieser Arbeit aufgezeigten analytischen Schwierigkeiten. Dennoch haben andere Arbeitsgruppen ähnliche Fragestellungen bearbeitet. Sei es die Detektion und Charakterisierung von fPSA-Subformen in Hinblick auf den pathophysiologischen Aspekt des erhöhten %fPSA bei BPH im Gegensatz zum PCa oder direkt mit der Zielsetzung, damit einen Biomarker zur Differenzierung zwischen BPH und PCa zu finden. Es wurden dabei sowohl unterschiedliche Ausgangsprobenmaterialien als auch unterschiedliche Analyseverfahren angewandt.

So untersuchten Charrier et al. [95,112] Serum von 40 BPH- und 52 PCa-Patienten mittels 2D-Elektrophorese und Immunoblot. Die tPSA-Werte der meisten Proben lagen etwa bei 1 - 30 µg/l. Exakte Mittelwerte und Variationsbreiten wurden nicht angegeben. 8 PCa-Seren hatten einen tPSA-Wert zwischen 30 und 3000 µg/l. Ohne eine vorausgehende PSA-Aufreinigung wurden 100 µl Serum in einer SDS / DTT – Lösung kurzzeitig gekocht und anschließend der 2D-Elektrophorese zugeführt. Auch hier beinhaltete der Rehydratisierungspuffer der 1. Dimension Harnstoff und Thioharnstoff. Die Beladung mit 100 µl Probenvolumen wurde durch die Verwendung von 18 cm IPG Streifen mit einem Gradienten von pH 3 – 10 möglich. Die Detektion erfolgte mittels eines eigens entwickelten monoklonalen PSA-Antikörpers (bioMerieux, Marcy L'Etoile, Frankreich; 13C9E9D6G8 anti-PSA). Leider stand mir dieser Antikörper nur in einer kleinen Menge für wenige vergleichende Versuche zur Verfügung. Doch auch dessen ungeachtet zog ich dem monoklonalen PSA-Antikörper von bioMerieux einen polyklonalen PSA-Antikörper vor, da dieser im allgemeinen nicht nur die intakte Hauptform des fPSA, sondern auch eine große Anzahl an PSA-Subformen bzw. -Bruchstücken zu detektieren vermag [96]. Dennoch sind die Spotmuster, die man mit dem PSA-Antikörper von bioMerieux und dem von mir verwendeten PSA-Antikörper von DAKO durchaus gleich (s. Abbildung 16).

Insgesamt liegt die untere Detektionsgrenze des von Charrier et al. beschriebenen Verfahrens im Vergleich zu meiner Methode (10 pg fPSA) etwas höher. Es waren Charrier et al. deshalb wohl auch nicht möglich, so viele fPSA-Subformen zu detektieren oder gar individuell zu charakterisieren, wie ich dies in der vorliegenden Arbeit dargestellt habe.

Aufgrund der Verwendung von großen Gelen in der 2D-Elektrophorese und auch des Tankblottverfahrens ist das Analyseverfahren nach Charrier et al. auch vom Kosten- und Zeitaspekt unvorteilhafter.

Hilz et al. [113] untersuchten ebenfalls Seren von PCa und BPH- Patienten mit tPSA-Werten von  $< 10$  bis  $40 \mu\text{g/l}$ . Es wurden dabei vor allem auch Seren verwendet, die während transvesikaler Prostatektomie bei BPH gewonnen wurden. Die eingesetzten Proben dieser so genannten TVP-Seren hatten ein Volumen von  $20 - 300 \text{ ml}$  und wurden nach einer Membranfiltration ( $1,2 \mu\text{m}$ ) einer Immunaффinitätschromatographie zugeführt. Dabei erfolgte die PSA-Adsorption an einen polyklonalen IgG PSA-Antikörper, der an Protein A-Agarose gekoppelt war [114,115]. Das PSA wurde anschließend durch  $6 \text{ mol/l}$  Harnstoff ( $\text{pH } 2,7$ ) eluiert und in Tris-HCl Puffer ( $\text{pH } 8,3$ ) neutralisiert. Im Falle der Serumprobe lagen in dem Eluat auffällig viele Immunglobuline vor, die an ungeblocktes Protein A der festen Phase gebunden wurde. Daher war hier ein weiterer chromatographischer Durchgang über reine Protein A-Agarose notwendig. Im Anschluss wurde eine Größenausschlusschromatographie mit Analyse von tPSA und fPSA durchgeführt. Alternativ erfolgte die Auftrennung der PSA-Subformen durch SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot. Zusätzlich wurden Banden ausgeschnitten und deren Analyse mit N-terminaler Aminosäuresequenzierung vorgenommen.

Auffällig bei diesen Untersuchungen sind zunächst die großen Probenvolumina, die eine deutlich größere PSA-Menge und damit leichter zu detektierende Subformen zur Folge hatten. Dadurch zwingend wurde auch hier eine Aufreinigung des Probenmaterials durchgeführt. Deren Effektivität bezifferten Hilz et al. auf  $\geq 93 \%$  im Falle von Seminalplasma. Serum-PSA ließ sich zu  $73 - 87 \%$  extrahieren. Damit liegt die Effektivität, des von mir angewendeten Immunsorptionsverfahrens mit  $> 97 \%$  deutlich höher, auch wenn diese Differenz zweifellos durch die von Hilz et al. verwendeten Probenvolumina mehr als kompensiert werden. Zusätzlich erbrachten Hilz et al. den Nachweis über einen unveränderten %fPSA vor und nach der Aufreinigung und leitet davon ab, dass fPSA durch die Prozedur weder in seiner Menge reduziert, noch aus Komplexen mit Serum-Proteaseninhibitoren herausgelöst wird. Dies ergab sich in gleicher Weise auch für die von mir angewandte Methode (Tabelle 7).

Die Größenausschlusschromatographie erlaubte neben der orientierenden Darstellung der fPSA-Heterogenität keine konkreteren Aussagen. Die SDS-PAGE erlaubte lediglich eine 1-dimensionale Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse, eine weitere Differenzierung nach dem jeweiligem isoelektrischen Punkt und dadurch Darstellung einzelner Subformen erfolgt dabei nicht. Doch kumulieren Subformen gleicher Masse in einer Bande,

was deren Detektion als Gruppe eher ermöglicht. So konnten Hilz et al. bis zu 7 Gruppen von fPSA-Subformen mit Molekülmassen von 33 – 9 kDa definieren. Durch die Anwendung der N-terminalen Aminosäuresequenzierung wurden die durch SDS-PAGE getrennten Subformgruppen exakter charakterisiert. So konnten die Aminosäuresequenz des nativen PSA und der Bruchstücke, sowohl N- als auch C-terminalseitig und die sich daraus errechenbaren Molekülmasse ermittelt werden. Allerdings wurden für diese Untersuchungen ausschließlich TVP-Seren verwendet, die durch die Operation bedingt, stark erhöhte PSA-Konzentrationen aufwiesen. Der Kritik, dass es sich hierbei um eine iatrogen veränderte Serumzusammensetzung handelt, entgegneten Hilz et al. mit Verweis auf gleiche Banden von TVP- und gewöhnlich gewonnenen Serum in der SDS-PAGE und auf gleiche Spotmuster in allerdings unveröffentlichten 2D-Elektrophorese-Analysen.

Isono et al. [96] erstellten in einer umfangreichen Arbeit einen Katalog von fPSA-Subformen aus Seminalplasma und untersuchten deren Vorkommen in Prostatagewebe von BPH-Patienten nach transurethraler Prostataresektion und in Karzinomzelllinien (LNCaP) sowie in 2 Seren von PCa-Patienten. Das Seminalplasma wurde zunächst durch Ammoniumsulfat-Präzipitation, hydrophobe Interaktionschromatographie, Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie gereinigt [94]. Trotz eines deutlichen PSA-Verlustes von > 50 % und möglicher Molekülveränderungen im Laufe dieser Prozedur wählte die Arbeitsgruppe diese Form der PSA-Konzentrierung.

Mit dem gereinigten Seminalplasma wurde eine 2D-Elektrophorese durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie Blue angefärbt und alternativ wurden Glycoproteine mit GelCode Glycoprotein Staining Kit von Pierce markiert. Anschließend konnten die Spots ausgeschnitten und mittels Massenspektroskopie analysiert werden. Auf eine Blotmembran übertragen und ebenfalls mit Coomassie Blue sichtbar gemacht, konnten einzelne Spots einer Aminosäuresequenzierung unterzogen werden. Damit erhielten Isono et al. eine Charakterisierung von 20 in Seminalplasma gefundenen PSA-Subformen. Kriterien dabei waren die Aminosäuresequenz, die daraus errechnete Molekülmasse bzw. der isoelektrische Punkt, die N-terminale Aminosäuresequenz und ein positives bzw. negatives Kohlenwasserstoffsignal. Es stellten sich Subformen mit verschiedenen Abbrüchen der Aminosäuresequenz, N-terminal- oder C-terminalseitig, damit Molekulargewichten von 28 - 6 kDa, in glycosilierter oder nichtglycolisierter Form dar.

Insgesamt stellt dies den bisher umfangreichsten Katalog an PSA-Subformen dar, der künftig hilfreich sein wird, Subformen zu identifizieren und zu vergleichen.



Dennoch ist das Ausgangsmaterial massiv verarbeitetes Seminalplasma und damit nicht repräsentativ für Serum-PSA. Allein die proPSA Formen sind im Seminalplasma im Gegensatz zum Serum nicht zu finden [90]. Diese Brücke versuchten die Autoren durch den Vergleich der charakterisierten Spots mit Spots aus einer 2D-Elektrophorese und Immunoblot von 2 PCa-Seren zu schlagen. Da bei der Serumanalyse keine vorherige Aufreinigung stattfand, wurden 2 Seren mit tPSA-Werten von 1900 und 3500 µg/l verwendet. Dennoch konnten nur die höhermolekularen Subformen zur Darstellung gebracht werden. Bisher ist die Zusammensetzung der fPSA-Subformen in Seren in Abhängigkeit von der PSA-Konzentration nicht untersucht worden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Muster der fPSA-Subformen vom Krankheitszustand abhängig sind. Seren mit solch hohen PSA-Konzentrationen, wie sie durch Isono et al. analysiert wurden stammen in der Regel von metastasierten Patienten, die meistens antihormonell behandelt wurden. Daher ist der in meiner Arbeit gewählte Ansatz berechtigt, von vornherein nur Seren mit PSA-Konzentrationen einzusetzen, die für die Diagnostik bedeutsam sind. Dies ist der so genannte Grauzonenbereich des PSA von 2 – 20 µg/l. Nur so ist es möglich ein relevantes Muster der fPSA-Subformen zu erstellen und daraus potentielle Tumormarker selektieren zu können. Quantitativen Aussagen über einzelne fPSA-Subformen wurden in diesem Zusammenhang noch nie publiziert.

#### 4.3 Diskussion der klinischen Ergebnisse

Mittels der beschriebenen Analytik wurden jeweils 50 Seren von BPH- und PCa-Patienten untersucht. Die Ergebnisse der 2D-Elektrophoresedaten ließen sich in Beziehung zu den klinischen Befunden hinsichtlich zweier Aspekte für eine diagnostische Auswertung beurteilen:

1. Unterschieden sich die Elektrophoresemuster zwischen BPH- und PCa-Patienten, das heißt werden zum Beispiel bei PCa-Patienten andere PSA-Spots als bei BPH-Patienten beobachtet und kann damit zwischen den Patientengruppen differenziert werden? Dies ist gewissermaßen eine qualitative Betrachtungsweise.
2. Unterscheiden sich die bei beiden Patientengruppen beobachteten gleichen fPSA-Subformen hinsichtlich ihrer gemessenen Intensitäten auf dem Immunoblot? Erlauben quantitative Unterschiede der Intensitäten unter Anwendung einer Diskriminationsgrenze die Differenzierung zwischen den Patientengruppen? Dies kann als quantitativer Aspekt angesehen werden.

Bei den Untersuchungen der Patienten wurden mindestens 15 sich in Molekülmasse und bzw. oder in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheidende immunreaktive fPSA-Subformen

dargestellt werden (s. Abbildung 23 und Tabelle 9). Die beiden Hauptspots F2 und F3 sind durch eine Molekülmasse von etwa 33 kDa und einem isoelektrischen Punkt zwischen pH 6,6 und 6,8 charakterisiert. Weitere Spots mit einer höheren Molekülmasse von etwa 35 kDa (A, B, C, D) ließen sich nur in PCa-Seren darstellen. Andere Spots liegen weiter im sauren Bereich und haben eine geringere Molekülmasse.

Soweit entsprechen die Ergebnisse den Arbeiten von Charrier et al. [95,112]. Doch sie beschreiben die Spots nicht detaillierter. Diese Arbeiten unterscheiden lediglich „standardgewichtige“ (standard weight, swPSA) fPSA-Subformen mit einem Molekulargewicht von etwa 32 kD und „leichtgewichtige“ (low weight, lwPSA) Subformen mit einem Molekulargewicht von < 32kDa. Darüber hinaus wurde ein höherer Anteil an lwPSA in BPH-Seren nachgewiesen. Schließlich wurde bei einem Grenzwert von < 6,5 % des Quotienten lwPSA zu swPSA eine bessere Differenzierung zwischen BPH und PCa im Bereich von 4 - 10 µg/l tPSA erreicht. Es wurde eine 100 % richtige Diagnose der PCa bei 82,5 % richtiger Diagnose der BPH erzielt, während mit Hilfe des konventionellen %fPSA-Wertes 73,1 % richtige PCa bei 42,5 % richtiger BPH erzielt werden.

Da der Anteil an lwPSA-Formen nur etwa 5 – 10 % des fPSA [95,112] ausmacht, ist deren Detektion erschwert. Charrier et al. bieten hier auch keine detaillierten Daten über die Häufigkeit des Auftretens dieser Subformen.

Mir standen keine speziellen Antikörper z.B. gegen BPSA und proPSA, wie ich sie im theoretischen Teil meiner Arbeit erläutert habe, zur Verfügung. So konnten diese Formen nicht speziell im Spotmuster dargestellt werden. Die Spots F4 und G könnten Formen des proPSA darstellen. Auch Charrier et al. [95], die diese Spots ebenfalls darstellten, vermuteten dies. Die Spots E, F1, F2, und F3 könnten Formen des intakten fPSA sein, die sich nur durch die Art ihrer Glycolisierung unterscheiden. Diese Formen haben ähnliche Molekülmassen, unterscheiden sich jedoch in ihrem isoelektrischen Punkt [41,116-118]. Dies wurde mehrfach an PSA aus Seminalplasma beschrieben. So sind sowohl der Grad der Glycosilierung als auch die Struktur der Glycane entscheidend für die Molekülladung des PSA, darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen PCa und der Glycolisierungsart [118].

Die Spots J, K und L hingegen unterscheiden sich zusätzlich durch ihre verschiedenen, geringeren Molekülmassen. Damit stellen sie Subformen dar, die durch proteolytische Molekülsplaltungen entstanden sind. Diese Formen wurden bereits in Kapitel 1.2.1.7 erwähnt und wurden in den bereits mehrfach zitierten Arbeiten von Hilz et al. und Isono et al. beschrieben. Eine weitere Möglichkeit sind durch alternatives Splicing des hKLK3 Gens, das PSA codiert, entstandene kürzere Formen des PSA. Diese Formen sind bisher jedoch nur in Prostatagewebe dokumentiert worden [119,120].

Als PCa-spezifisch können die Spots A, B, C und D gelten. Diese Spots, bei einer Molekülmasse von etwa 35 kDa gelegen, wurden ausschließlich in PCa-Seren nachgewiesen. Hier allerdings nur in 3 – 4 von 50 Fällen. Angesichts des seltenen Auftretens dieser Formen konnten sie in dieser Arbeit nicht zur allgemein anwendbaren Differenzierung zwischen BPH und PCa herangezogen werden. Das molekulare Korrelat zu diesen Spots ist derzeit noch unklar, doch sicherlich zukünftig von Interesse.

Während somit keine für die Diagnostik geeigneten krankheitstypischen Muster der fPSA-Subformen nachgewiesen werden konnten, ließen sich Unterschiede in einzelnen Subformen zwischen PCa- und BPH-Patienten feststellen (s. Abbildung 24).

Bemerkenswert unter allen Spots sind F2 und F3. Diese beiden konnten in allen untersuchten Seren, sowohl von BPH- als auch PCa-Patienten dargestellt werden. Damit ist eine Grundvoraussetzung gegeben, sie als Kenngröße für eine Differenzierung zwischen beiden Patientengruppen einzusetzen. Darüber hinaus wiesen sie gegensätzliche Konzentrationen in BPH- und PCa-Seren auf. So ist die Intensität von F2 bei einem PCa höher als bei einer BPH. Entsprechend ist die Intensität von F3 bei BPH höher. Besser noch als die Einzelbestimmungen für F2 und F3 eignete sich der Quotient aus den Intensitäten von F2 und F3, um zwischen BPH und PCa zu differenzieren. Die Quotientenbildung hat den wesentlichen Vorteil, dass damit der Bezug auf fPSA nicht notwendig ist und somit analytische Schwankungen bei der Lumineszenzreaktion ausgeglichen werden können.

Die diagnostische Validität einer neuen Kenngröße muss an den bisherigen etablierten konventionellen Parametern gemessen werden. Für die Prostatakarzinomdiagnostik sind dies die Parameter tPSA und neuerdings %fPSA. In der Einleitung habe ich die Bedeutung insbesondere des %fPSA beschrieben, sodass ich hier nur kurz zurückkommen muss.

In zahlreichen Studien konnte der klinische Nutzen von %fPSA demonstriert werden [75-77]. Vor allem bei rektal unauffälligem Tastbefund [121,122]. So kann durch die %fPSA-Ermittlung bei minimaler Reduktion der Sensitivität eine Verbesserung der Spezifität von 15 – 20 % gegenüber tPSA und DRU erreicht werden. Dies sind Studien, die Patienten mit unauffälligem rektalem Tastbefund und tPSA-Werten von 4 – 10 µg/l oder gar 2,5 – 4 µg/l untersuchten [123,124]. Somit ist %fPSA die derzeit am besten evaluierte und effektivste Messgröße zur Differenzierung zwischen BPH und PCa. An ihr müssen sich somit alle neueren Marker messen lassen.

Daher wurden für verschiedene Diskriminationsgrenzen Berechnungen von Spezifität und Sensitivität in ROC-Analysen angestellt. Betrachtet wurden F2 und F3 absolut und als Anteil an fPSA, sowie in Relation zueinander und in Relation zu %fPSA in einer Gegenüberstellung zu

tPSA und %fPSA. Dabei zeigte sich für die Quotienten  $F2 / F3$ ,  $F2 / F3 / \%fPSA$  und  $F2 / \%fPSA$  gegenüber dem alleinigen %fPSA eine Verbesserung der Differenzierung zwischen BPH und PCa (s. Tabellen 9 und 10). Damit ist die Schlussfolgerung berechtigt, dass mit den fPSA-Subformen F2 und F3 eine bessere diagnostische Validität erzielt werden kann als mit den bisher etablierten Kenngrößen tPSA oder %fPSA. Hervorzuheben ist die Rolle des  $F2 / F3 / \%fPSA$  im Bereich von %fPSA > 15 %. Hier vermag  $F2 / F3 / \%fPSA$  eine Differenzierung zwischen BPH und PCa, wohingegen dies weder durch tPSA noch durch %fPSA möglich ist (s. Abbildung 25). Eine ähnliche Differenzierung konnte Mikolajczyk [90] mit dem (2-)proPSA erzielen, allerdings erst ab einem %fPSA von > 25 %.

Abschließend ist zu bemerken, dass die beschriebene Analytik aufgrund hoher Kosten, eines großen Zeitaufwandes und einer hohen Lernkurve als standardisiertes Routineverfahren sicherlich ungeeignet ist. Doch durch weitere Strukturanalysen der fPSA-Subformen, insbesondere von F2 und F3, könnten spezifische Antikörper und damit kostengünstige, praktikable Assays entwickelt werden, die zu einer frühen Diagnose des PCa bei weiterer Reduktion unnötiger Prostatastanzbiopsien beitragen können.

## 5 Zusammenfassung

Das PCa ist mit 22,3 % der geschätzten Krebsneuerkrankungen die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes in Deutschland. Die Mortalität betreffend steht das PCa bei Männern an dritter Stelle. Um das PCa kurativ behandeln zu können, ist seine frühzeitige Entdeckung in einem das Organ nicht überschreitenden Stadium erforderlich. Einen großen Fortschritt in der Diagnostik brachte hier die Anwendung der PSA-Bestimmung.

Die digital rektale Prostatapalpation, tPSA und %fPSA sind derzeit der Kernpunkt der Prostatadiagnostik in Hinblick auf eine Differenzierung von BPH und PCa. Die dadurch erlangte hohe Sensitivität lässt aber dennoch eine entsprechende Spezifität vermissen. Da das tPSA zwar weitgehend prostataspezifisch aber nicht karzinomspezifisch ist, also in diesem Sinne keinen Tumormarker darstellt, ist in einem Grauzonenbereich von 2 – 20 µg/l tPSA eine Differenzierung zwischen malignen und benignen Geschehen nicht möglich. Erst %fPSA konnte hier eine Verbesserung schaffen. Die Heterogenität des fPSA ließ allerdings hoffen, Subformen zu finden, mit denen sich eine weitere Verbesserung der diagnostischen Aussage erreichen ließe.

Ich habe eine Analytik mittels 2D-Elektrophorese, Western-Blot und Immundetektion entwickelt und optimiert, die es ermöglicht, die fPSA Fraktion bis in den unteren Pikogrammbereich in ihre Subformen aufgetrennt darzustellen und diese zu quantifizieren. Durch die PSA-Anreicherung der Serumproben mittels Immunsorption konnte der zunächst limitierende Faktor der Proteinüberladung in der 2D-Elektrophorese beseitigt und damit die Analytik entscheidend verbessert werden. So waren schließlich einzelne fPSA-Subformen bis zu einer fPSA-Konzentration von 0,1 µg/l detektierbar.

Es folgte eine Analyse von jeweils 50 Seren von BPH- bzw. PCa-Patienten mit einem tPSA von 2 – 20 µg/l. Dabei konnten mindestens 15 verschiedene fPSA-Subformen dargestellt und quantifiziert werden. Nach der Lage auf dem Immunoblot wurden sie mit Buchstaben und Buchstaben-Zahlen-Kombinationen gekennzeichnet. Darunter waren die PCa-spezifischen Subformen A, B, C und D mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa (damit deutlich größer als das reife, inaktive PSA mit einem Molekulargewicht von etwa 33 kDa). Da diese Formen jedoch nur zu etwa 7 % detektiert wurden, ließen sie sich nicht zur Differenzierung zwischen BPH und PCa heranziehen. Dennoch wäre eine Isolierung und Charakterisierung dieser Fraktionen bis hin zur Entwicklung von spezifischen Antikörpern möglicherweise Erfolg versprechend.

Im Bereich der Subformen mit einem Molekulargewicht von 33 kDa fanden sich 2 Formen, F2 und F3, die in allen Serumproben sowohl von BPH als auch von PCa-Patienten anzutreffen waren. Dabei war die Intensität von F2 im Falle der BPH geringer, bei einem PCa dagegen

stärker. F3 verhält sich genau gegensätzlich. Nach der Berechnung von Sensitivität und Spezifität ergab sich vor allem für den Quotienten F2 / F3 / %fPSA ein deutlicher Vorteil hinsichtlich der diagnostischen Aussagekraft gegenüber tPSA und %fPSA. So lässt sich eine korrekte Klassifizierung von BPH und PCa mit %fPSA auf 66,7 % berechnen. Mit dem Quotienten F2 / F3 lassen sich 76,3 %, mit F2 / F3 / %fPSA gar 80,6 % erreichen. Speziell bei Seren mit einem %fPSA von > 15 % macht sich diese bessere Diskriminationsrate bemerkbar. Dies ist vorteilhaft, da eine Differenzierung anhand von tPSA und %fPSA in diesem Bereich nicht mehr möglich ist.

Als standardisiertes Routineverfahren ist die beschriebene Analytik sicherlich ungeeignet. Neben hohen Kosten und zeitlichem Aufwand setzen Immunsorption, 2D-Elektrophorese und Immunoblot sehr speziell geschultes Personal voraus. Durch weitere Strukturanalysen der fPSA-Subformen, insbesondere von F2 und F3, könnten spezifische Antikörper und damit kostengünstige, praktikable Assays entwickelt werden, die zu einer frühen Diagnose des PCa bei weiterer Reduktion unnötiger Prostatastanzbiopsien beitragen können.

**Literaturverzeichnis**

1. Jung K, Reiche J, Boehme A, Stephan C, Loening SA, Schnorr D, et al. Analysis of subforms of free prostate-specific antigen in serum by 2-dimensional gel electrophoresis: potential to improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 2004;50:2292-301.
2. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends 2006;5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe:
3. Sheldon CA, Williams RD, Fraley EE. Incidental carcinoma of the prostate: a review of the literature and critical reappraisal of classification. *J Urol* 1980;124:626-31.
4. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 1993;150:379-85.
5. 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.
6. GfK Marktforschung. Representative Umfrage bei 1977 Bundesbürgern. Apothekenumschau 2004;Nr. 3:
7. Babaian RJ, Dinney CP, Ramirez EI, Evans RB. Diagnostic testing for prostate cancer detection: less is best. *Urology* 1993;41:421-5.
8. Gohji K, Okamoto M, Morisue K, Fujii A. Usefulness of digital rectal examination, serum prostate-specific antigen, transrectal ultrasonography and systematic prostate biopsy for the detection of organ-confined prostate cancer. *Int J Urol* 1995;2:116-20.
9. Tan HH, Gan E, Rekhraj I, Cheng C, Li MK, Thng P, et al. Use of prostate specific antigen (PSA) and transrectal ultrasound (TRUS) in the diagnosis of prostate cancer-a local experience. *Ann Acad Med Singapore* 1995;24:550-6.
10. Ciatto S, Bonardi R, Lombardi C, Cappelli G, Castagnoli A, D'Agata A, et al. Predicting prostate biopsy outcome by findings at digital rectal examination, transrectal ultrasonography, PSA, PSA density and free-to-total PSA ratio in a population-based screening setting. *Int J Biol Markers* 2001;16:179-82.
11. Hodge KK, McNeal JE, Stamey TA. Ultrasound guided transrectal core biopsies of the palpably abnormal prostate. *J Urol* 1989;142:66-70.
12. Collins GN, Lloyd SN, Hehir M, McKelvie GB. Multiple transrectal ultrasound-guided prostatic biopsies--true morbidity and patient acceptance. *Br J Urol* 1993;71:460-3.
13. Partin AW, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994. *J Urol* 1994;152:1358-68.
14. Brawer MK, Chetner MP, Beatie J, Buchner DM, Vesella RL, Lange PH. Screening for prostatic carcinoma with prostate-specific antigen. *J Urol* 1992;147:841-5.
15. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA* 1993;270:948-54.

16. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994;151:1283-90.
17. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL, Jr., Beard JH, Pond HS, Terry WJ, et al. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol* 1990;143:1146-52.
18. Labrie F, Dupont A, Suburu R, Cusan L, Tremblay M, Gomez JL, et al. Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer. *J Urol* 1992;147:846-51.
19. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 1991;324:1156-61.
20. Hammerer P, Graefen M, Henke RP, Haese A, Huland E, Huland H. Ratio free/total PSA (%f-PSA) in men with total PSA 0.5-3 ng/ml - Improvement for prostate cancer detection? (Abstract). *J Urol [Suppl]* 2000;163:277A.
21. Roobol MJ, Kranse R, van dC, I, Schroder FH. A more advanced clinical stage is positively correlated with an increased prostate cancer detection rate. *Urology* 2002;59:91-6.
22. 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.
23. 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]. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1971;25:322-4.
24. Li TS, Beling CG. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertil Steril* 1973;24:134-44.
25. 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.
26. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159-63.
27. Clements JA, Mukhtar A. Glandular kallikreins and prostate-specific antigen are expressed in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1536-9.
28. Elgamal AA, Ectors NL, Sunardhi-Widyaputra S, Van Poppel HP, Van Damme BJ, Baert LV. Detection of prostate specific antigen in pancreas and salivary glands: a potential impact on prostate cancer overestimation. *J Urol* 1996;156:464-8.
29. Yu H, Diamandis EP, Sutherland DJ. Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem* 1994;27:75-9.
30. Yu H, Diamandis EP, Levesque M, Giai M, Roagna R, Ponzzone R, et al. Prostate specific antigen in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 1996;40:171-8.



31. Frazier HA, Humphrey PA, Burchette JL, Paulson DF. Immunoreactive prostatic specific antigen in male periurethral glands. *J Urol* 1992;147:246-8.
32. Hilz H. [Molecular forms of prostate-specific antigen and their clinical significance]. *Urologe A* 1995;34:275-82.
33. Kamoshida S, Tsutsumi Y. Extraprostatic localization of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen: distribution in cloacogenic glandular epithelium and sex-dependent expression in human anal gland. *Hum Pathol* 1990;21:1108-11.
34. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res* 1980;40:2428-32.
35. Lundwall A, Lilja H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett* 1987;214:317-22.
36. Schaller J, Akiyama K, Tsuda R, Hara M, Marti T, Rickli EE. Isolation, characterization and amino-acid sequence of gamma-seminoprotein, a glycoprotein from human seminal plasma. *Eur J Biochem* 1987;170:111-20.
37. Watt KW, Lee PJ, M'Timkulu T, Chan WP, Loor R. Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:3166-70.
38. Kuriyama M, Wang MC, Papsidero LD, Killian CS, Shimano T, Valenzuela L, et al. Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer Res* 1980;40:4658-62.
39. McCormack RT, Rittenhouse HG, Finlay JA, Sokoloff RL, Wang TJ, Wolfert RL, et al. Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. *Urology* 1995;45:729-44.
40. Kuriyama M, Wang MC, Lee CI, Papsidero LD, Killian CS, Inaji H, et al. Use of human prostate-specific antigen in monitoring prostate cancer. *Cancer Res* 1981;41:3874-6.
41. Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate* 1981;2:89-96.
42. Wang TY, Kawaguchi TP. Preliminary evaluation of measurement of serum prostate-specific antigen level in detection of prostate cancer. *Ann Clin Lab Sci* 1986;16:461-6.
43. Riegman PH, Vlietstra RJ, Suurmeijer L, Cleutjens CB, Trapman J. Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics* 1992;14:6-11.
44. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001;22:184-204.
45. Malm J, Lilja H. Biochemistry of prostate specific antigen, PSA. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1995;221:15-22.
46. Bunting PS. A guide to the interpretation of serum prostate specific antigen levels. *Clin Biochem* 1995;28:221-41.
47. Brawer MK, Schifman RB, Ahmann FR, Ahmann ME, Coulis KM. The effect of digital rectal examination on serum levels of prostatic-specific antigen. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:1110-2.

48. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987;317:909-16.
49. Yuan JJ, Coplen DE, Petros JA, Figenschau RS, Ratliff TL, Smith DS, et al. Effects of rectal examination, prostatic massage, ultrasonography and needle biopsy on serum prostate specific antigen levels. *J Urol* 1992;147:810-4.
50. Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ. Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations. *Urology* 1997;50:239-43.
51. Hudson MA, Bahnson RR, Catalona WJ. Clinical use of prostate specific antigen in patients with prostate cancer. *J Urol* 1989;142:1011-7.
52. Kuriyama M, Wang MC, Papsidero LD, Killian CS, Shimano T, Valenzuela L, et al. Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer Res* 1980;40:4658-62.
53. Monda JM, Barry MJ, Oesterling JE. Prostate specific antigen cannot distinguish stage T1a (A1) prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1994;151:1291-5.
54. Beduschi MC, Oesterling JE. Percent free prostate-specific antigen: the next frontier in prostate-specific antigen testing. *Urology* 1998;51(Suppl 5A):98-109.
55. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. *J Am Med Assoc* 1993;270:860-6.
56. Veneziano S, Pavlica P, Querze R, Nanni G, Lalanne MG, Vecchi F. Correlation between prostate-specific antigen and prostate volume, evaluated by transrectal ultrasonography: usefulness in diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 1990;18:112-6.
57. Semjonow A, Hamm M, Rathert P, Hertle L. Prostate-specific antigen corrected for prostate volume improves differentiation of benign prostatic hyperplasia and organ-confined prostatic cancer. *Br J Urol* 1994;73:538-43.
58. Schmid HP. Verbesserung der Spezifität des prostataspezifischen Antigens. *Urologe B* 1998;38:46-8.
59. Zlotta AR, Djavan B, Marberger M, Schulman CC. Prostate specific antigen density of the transition zone: a new effective parameter for prostate cancer prediction. *J Urol* 1997;157:1315-21.
60. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 1984;132:474-9.
61. Schmid HP, McNeal JE, Stamey TA. Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer* 1993;71:2031-40.
62. Carter HB, Pearson JD. Prostate-specific antigen velocity and repeated measures of prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am* 1997;24:333-8.
63. 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.

64. Luboldt H-J, Rübber H. PSA - Früherkennung des Prostatakarzinoms. *Urologe A* 2000;39:22-6.
65. 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.
66. Christensson A, Björk T, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen MT, Cockett ATK, et al. Serum prostate specific antigen complexed to  $\alpha_1$ -antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol* 1993;150:100-5.
67. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with  $\alpha_1$ -antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991;37:1618-25.
68. 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.
69. 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.
70. Lilja H. Regulation of the enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with cellular protease inhibitors in prostate cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55 (Suppl 220):47-56.
71. Tewari PC, Bluestein BI. Multiple forms of prostate specific antigen and the influences of immunoassay design on their measurement in patient serum. *J Clin Ligand Assay* 1996;18:186-96.
72. Peter J, Unverzagt C, Hoesel W. Analysis of free prostate-specific antigen (PSA) after chemical release from the complex with alpha(1)-antichymotrypsin (PSA-ACT). *Clin Chem* 2000;46:474-82.
73. Zhang WM, Finne P, Leinonen J, Vesalainen S, Nordling S, Rannikko S, et al. Characterization and immunological determination of the complex between prostate-specific antigen and alpha2-macroglobulin. *Clin Chem* 1998;44:2471-9.
74. 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.
75. Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC, Subong ENP, Gasior GH, Chan DW. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age. *Urology* 1996;48 (Suppl 6A):55-61.
76. Luderer AA, Chen YT, Soriano TF, Kramp WJ, Carlson G, Cuny C, et al. Measurement of the proportion of free to total prostate-specific antigen improves diagnostic performance of prostate-specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate-specific antigen. *Urology* 1995;46:187-94.
77. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *J Am Med Assoc* 1995;274:1214-20.

78. Littrup PJ, Kane RA, Mettlin CJ, Murphy GP, Lee F, Toi A, et al. Cost-effective prostate cancer detection. Reduction of low-yield biopsies. Investigators of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. *Cancer* 1994;74:3146-58.
79. Murphy GP, Barren RJ, Erickson SJ, Bowes VA, Wolfert RL, Bartsch G, et al. Evaluation and comparison of two new prostate carcinoma markers. Free-prostate specific antigen and prostate specific membrane antigen. *Cancer* 1996;78:809-18.
80. Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, Rittenhouse HG. Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology* 2002;59:797-802.
81. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 2003;21:383-91.
82. Chen Z, Chen H, Stamey TA. Prostate specific antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization. *J Urol* 1997;157:2166-70.
83. Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS. Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Res* 1997;57:3111-4.
84. Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW. Characterization of the precursor of prostate-specific antigen. Activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J Biol Chem* 1997;272:21582-8.
85. Lövgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall A, Lilja H. Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:549-55.
86. Brawer MK, Rennels MA, Nagle RB, Schifman R, Gaines JA. Serum prostate-specific antigen and prostate pathology in men having simple prostatectomy [see comments]. *Am J Clin Pathol* 1989;92:760-4.
87. Bostwick DG. Prostate-specific antigen. Current role in diagnostic pathology of prostate cancer. *Am J Clin Pathol* 1994;102:S31-S37.
88. Chan TY, Mikolajczyk SD, Lecksell K, Shue MJ, Rittenhouse HG, Partin AW, et al. Immunohistochemical staining of prostate cancer with monoclonal antibodies to the precursor of prostate-specific antigen. *Urology* 2003;62:177-81.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. 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.

93. Linton HJ, Marks LS, Millar LS, Knott CL, Rittenhouse HG, Mikolajczyk SD. Benign prostate-specific antigen (BPSA) in serum is increased in benign prostate disease. *Clin Chem* 2003;49:253-9.
94. Zhang WM, Leinonen J, Kalkkinen N, Dowell B, Stenman UH. Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. *Clin Chem* 1995;41:1567-73.
95. Charrier JP, Tournel C, Michel S, Comby S, Jolivet-Reynaud C, Passagot J, et al. Differential diagnosis of prostate cancer and benign prostate hyperplasia using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2001;22:1861-6.
96. Isono T, Tanaka T, Kageyama S, Yoshiki T. Structural diversity of cancer-related and non-cancer-related prostate-specific antigen. *Clin Chem* 2002;48:2187-94.
97. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;16:1090-4.
98. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21.
99. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982;6:317-39.
100. Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer Berlin Heidelberg New York 1997;
101. Raymond S, Weintraub L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 1959;130:711.
102. Hochstrasser DF, Patchornik A, Merrill CR. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal Biochem* 1988;173:412-23.
103. Gorg A, Weiss W. Analytical IPG-Dalt. *Methods Mol Biol* 1999;112:189-95.
104. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembling of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
105. Kyhse-Andersen J. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10:203-9.
106. Islam R, Ko C, Landers T. A new approach to rapid immobilised pH gradient IEF for 2-D electrophoresis. *Science Tools* 1998;3:14-5.
107. Berkelmann T, Stenstedt T. *2-D Electrophoresis Using immobilized pH gradients, Principles & Methods*, Piscataway, NJ: Amersham Pharmacia Biotech, 1998:24.
108. Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1997;18:307-16.

109. Ramlau J, Bjerrum OJ. Labeling immunoelectrophoresis: a general method for increasing the sensitivity of rocket immunoelectrophoresis with <sup>125</sup>I-labeled anti-antibodies. *Scand J Immunol* 1977;6:867-71.
110. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, 6th ed. New York: Wiley-Liss, 2002:184-187.
111. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974;111:58-64.
112. Charrier JP, Tournel C, Michel S, Dalbon P, Jolivet M. Two-dimensional electrophoresis of prostate-specific antigen in sera of men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. *Electrophoresis* 1999;20:1075-81.
113. Hilz H, Noldus J, Hammerer P, Buck F, Lück M, Huland H. Molecular heterogeneity of free PSA in sera of patients with benign and malignant prostate tumors. *Eur Urol* 1999;36:286-92.
114. Simanis V, Lane DP. An immunaffinity purification procedure for SV40 large T antigen. *Virology* 1985;144:88-100.
115. Schneider C, Newman RA, Sutherland DR, Asser U, Greaves MF. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* 1982;257:10766-9.
116. Huber PR, Schmid HP, Mattarelli G, Strittmatter B, Vansteenbrugge GJ, Maurer A. Serum free prostate specific antigen: isoenzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate. *Prostate* 1995;27:212-9.
117. Okada T, Sato Y, Kobayashi N, Sumida K, Satomura S, Matsuura S, et al. Structural characteristics of the N-glycans of two isoforms of prostate-specific antigens purified from human seminal fluid. *Biochim Biophys Acta* 2001;1525:149-60.
118. Peracaula R, Tabares G, Royle L, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, et al. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology* 2003;13:457-70.
119. Tanaka T, Isono T, Yoshiki T, Yuasa T, Okada Y. A novel form of prostate-specific antigen transcript produced by alternative splicing. *Cancer Res* 2000;60:56-9.
120. Heuze-Vourc'h N, Leblond V, Courty Y. Complex alternative splicing of the hKLK3 gene coding for the tumor marker PSA (prostate-specific-antigen). *Eur J Biochem* 2003;270:706-14.
121. Stephan C, Lein M, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Can prostate specific antigen derivatives reduce the frequency of unnecessary prostate biopsies?[Letter]. *J Urol* 1997;157:1371.
122. Lee CT, Scardino PT. Percent free prostate-specific antigen for first-time prostate biopsy. *Urology* 2001;57:594-8.
123. Catalona WJ, Partin AW, Finlay JA, Chan DW, Rittenhouse HG, Wolfert RL, et al. Use of percentage of free prostate-specific antigen to identify men at high risk of prostate cancer when PSA levels are 2.51 to 4 ng/mL and digital rectal examination is not suspicious for prostate cancer: an alternative model. *Urology* 1999;54:220-4.

124. 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.

## Erklärung

Ich, Axel Böhme, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Subformen des freien prostataspezifischen Antigens als diskriminatorische Biomarker zwischen benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom: Etablierung der Analytik mittels 2-Dimensionaler Elektrophorese und erste klinische Ergebnisse“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift



## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Klaus Jung danken, der mich mit großem Engagement, viel Zeit und Geduld bis zum Abschluss meiner Arbeit unterstützte.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Pranav Sinha bedanken, der mich in die Arbeit einführte und während der Laborzeit meine Arbeit betreute.

Frau Dr. Julia Poland, Herrn Gernot Reifenberger und Frau Dorothea Przybilla danke ich vielfach für die Unterstützung beim Erlernen der Arbeitsmethoden und für die angenehme, gemeinsame Zeit im Labor.

Frau Janett Reiche gilt besonderer Dank für die nette und kompetente Beihilfe in der Laborarbeit, ebenso den Mitarbeitern der urologischen Forschungsabteilung.

Ganz speziell möchte ich mich bei Herrn Dr. Hoesel von Roche Diagnostics GmbH Pharma Research Penzberg bedanken, der mir einen weiteren tiefen Einblick in wissenschaftliches Arbeiten geboten hat.

Der Sonnenfeldstiftung danke ich, dass sie die Anschaffung des Fluor-S Multimaggers ermöglicht hat. Ebenso danke ich der deutschen Forschungsgemeinschaft und Roche Diagnostics GmbH Pharma Research für die finanzielle Unterstützung der Forschungsarbeit.

Bei Herrn Dr. Hans Poland bedanke ich mich für die Bereitstellung eines Computers.

Schließlich danke ich meiner Frau, Christiana Tack, meinen Eltern, Marianne und Hartmut Böhme, sowie Martin Ringsdorf und Daniela Böhle für den tatkräftigen Beistand in schwierigen Phasen meiner Arbeit.