

**Verbesserte Diagnostik des Prostatakarzinoms
durch den Einsatz von neuen Tumormarkern und
die Anwendung artifizieller neuronaler Netzwerke**

**Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Urologie**

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der Charité
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**von
Dr. med. Carsten Stephan
geboren am 05.06.1970 in Pritzwalk**

Dekan: Prof. Dr. M. Paul

Datum der Habilitation: 13.11.2006

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. S.C. Müller, Urologische Klinik des Universitätsklinikums Bonn
2. Prof. Dr. med. C. Stief, Urologische Klinik des Klinikums der Universität München -
Großhadern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Vorbemerkungen	4
2. Einleitung und Zielstellung.....	5
3. Prostataspezifisches Antigen (PSA)	7
3.1 Stellenwert des PSA und seiner molekularen Formen	7
3.2 Eigene Arbeiten zu Isoformen des PSA und zu verschiedenen Auswerteverfahren hinsichtlich ihrer diagnostischen Validität.....	10
4. Artificielle neuronale Netzwerke und neue Serummarker für das PCa.....	13
4.1 Aufbau artifizierlicher neuronaler Netzwerke	13
4.2 Die Anwendung von ANN zur Diagnostik des PCa	16
4.3 Eigene Arbeiten zur Nutzung von ANN bei der Diagnostik des PCa.....	16
4.3.1 Entwicklung des Programms „ProstataClass“	16
4.3.2 ProPSA als neuer Serummarker im ANN.....	19
4.3.3 Humanes Kallikrein 11 (hK11), Makrophagen Inhibitor Cytokin-1 (MIC-1) und Makrophagen Migrationsinhibitor Faktor (MIF) als neue Serummarker des PCa	20
4.3.4 MIC-1, MIF und hK11 als neue Serummarker des PCa im ANN	21
4.4 Humanes glanduläres Kallikrein 2 (hK2) als Tumormarker für das PCa	22
5. Neue Tumormarker des PCa im Gewebe.....	23
5.1 Die Kallikreine 14 und 15.....	23
5.2 Hepsin und weitere Gewebemarker des PCa	24
6. Zusammenfassung und Ausblick	26
7. Literaturlisten.....	28
7.1 Literatur	28
7.2 Eigene Publikationen als Erstautor und Koautor	35
8. Danksagung und eidesstattliche Erklärung.....	39
Anlage: 13 Artikel als Erstautor	

Verwendete Abkürzungen

ACT-PSA	α_1 -Antichymotrypsin-PSA
ANN	artifizielles neuronales Netzwerk
API	α_1 -Protease-Inhibitor oder α_1 -Antitrypsin
AUC	Area under the curve (engl.) = Fläche unter der Kurve
A2M	α_2 -Makroglobulin
BPH	benigne Prostatahyperplasie
bPSA	benignes PSA (Subform des freien PSA)
cPSA	komplexiertes PSA
DNA	Desoxyribonucleic acid (engl.) = Desoxyribonukleinsäure
DRU	digital-rektale Untersuchung
fPSA	freies PSA
fPSA-i	inaktives freies PSA
hK2	humanes glanduläres Kallikrein 2 (Protein)
hK11	humanes Kallikrein 11 (Protein)
KLK1	pankreatisches/renales Kallikrein (Gen)
KLK2	humanes glanduläres Kallikrein 2 (Gen)
KLK3	Kallikrein 3 = prostataspezifisches Antigen PSA (Gen)
LR	logistische Regression
MIC-1	Makrophagen Inhibitor Cytokin-1
MIF	Makrophagen Migrationsinhibitor Faktor
PCa	Prostatakarzinom
%fPSA	prozentuales freies PSA
PSA	prostataspezifisches Antigen
RNA	Ribonucleic acid (engl.) = Ribonukleinsäure
ROC	Receiver-operating-characteristic
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (engl.) = Reverse Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion
tPSA	Gesamt-PSA
TRUS	transrektaler Ultraschall

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im letzten Kapitel möchte ich eine Zusammenfassung der Habilitationsschrift geben sowie die derzeit begonnenen und geplanten weiterführenden Projekte kurz beschreiben.

Die vorliegende Habilitationsschrift „Verbesserte Diagnostik des Prostatakarzinoms durch den Einsatz von neuen Tumormarkern und die Anwendung artifizieller neuronaler Netzwerke“ fasst Ergebnisse zusammen, die ich in den Jahren 1996-2005 als Erstautor und Koautor in wissenschaftlichen Artikeln von *peer reviewed* Zeitschriften veröffentlicht habe.

Gegenstand der Habilitationsschrift sind erstens Untersuchungen zur Optimierung und besseren Bewertung des PSA und seiner molekularen Formen sowie weiterer Kallikreine mittels neuer Auswertemethoden, wie den ANN, und zweitens die quantitative Expressionsanalyse neuer Biomarker im malignen und benignen Prostatagewebe. Im Mittelpunkt steht dabei die Verbesserung der Diagnostik des PCa.

Das PSA hat seit Beginn der klinischen Anwendung vor mehr als 20 Jahren bewiesen, dass es der beste Tumormarker für die frühzeitige Entdeckung des mittlerweile in der westlichen Welt häufigsten Malignoms, des PCa, ist. Die Diskrepanz zwischen Überdiagnostik einerseits und hohen Raten an Tumorzidiven andererseits unterstreicht jedoch, dass eine verbesserte Indikationsstellung zur Prostatabiopsie und die Suche nach Biomarkern für aggressive Tumoren von zunehmender Bedeutung ist.

Mit den ersten Untersuchungen zu den Einflussfaktoren des %fPSA unter besonderer Berücksichtigung des Prostatavolumens konnte ich die Grundlage für die ersten Biopsieempfehlungen auf der Basis der PSA-Konzentration und des %fPSA-Wertes schaffen.

Als Weiterentwicklung dieser von 1997 bis 2002 in unserer Klinik angewandten Biopsieempfehlungen habe ich gemeinsam mit Dr. Cammann ein ANN erarbeitet und multizentrisch evaluiert. Dieses schätzt mit Hilfe der fünf Parameter PSA, %fPSA, Alter, Prostatavolumen und Status der DRU das Risiko für das Vorliegen eines PCa ein. Das dafür entwickelte Computerprogramm „ProstataClass“ wird seit 2002 in der Routine unserer Klinik benutzt. Mit der zusätzlichen Einbeziehung anderer molekularer Formen des freien PSA sowie verschiedener Kallikreine konnte die diagnostische Aussagekraft des ANN weiter gesteigert werden. Keiner dieser neuen Marker ist jedoch allein für die klinische Routine geeignet. Eine Anwendung der ANN auf Patientengruppen mit unterschiedlichen PSA-Bestimmungsmethoden sowie Parallelmessungen gleicher Seren mit fünf verschiedenen PSA-Testsystemen und anschließenden ANN-Auswertungen zeigte die Notwendigkeit, jeweils testspezifische ANN zu entwickeln, um die diagnostische Aussagekraft zu optimieren.

Mit Hilfe der modernen Methode der quantitativen Echtzeit-PCR konnte ich nachweisen, dass Kallikrein 15 und insbesondere Hepsin deutlich im Karzinomgewebe überexprimiert sind. Beide Moleküle sind somit potentielle Kandidaten, als Serummarker zur PCa-Detektion eingesetzt zu werden.

Die in Bearbeitung und in Planung befindlichen Studien fokussieren auf die Evaluierung neuer Serumbiomarker sowie die Erweiterung und Verbesserung des ANN-Programms „ProstataClass“. Hierzu soll u.a. die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit als zusätzliche Eingangsgröße in das ANN einbezogen werden. Derzeit werden Patientendaten aus den Jahren von 1996-2005 evaluiert.

Ein weiterer Schwerpunkt ist die Verwendung neuer Biomarker innerhalb des ANN. Dabei werden das bPSA und die proPSA-Formen in Kooperation mit der Firma Beckman Coulter hinsichtlich ihrer Aussagekraft im ANN getestet. Möglicherweise können diese Serumparameter teilweise das Prostatavolumen oder den DRU-Befund ersetzen oder ergänzen. Diese Hoffnung besteht auch für hK15, für das erst kürzlich ein Serumtest vorgestellt wurde [142]. Zunächst wird aber die allgemeine Evaluierung des Markers bezüglich der Diskriminierungsfähigkeit zwischen PCa und BPH in Kooperation mit dem kanadischen Partner Prof. Diamandis erfolgen. Eine zusätzliche Möglichkeit der Evaluierung neuer Tumormarker ist die Ausweitung der Diagnostik von Serum bzw. Plasma und Gewebe auf den Nachweis im Urin, wobei hier Differential Display Code 3 (DD3) von unserer Arbeitsgruppe bereits bearbeitet wird [158].

Die Adaptation des ANN-Programms „ProstataClass“ an unterschiedliche PSA-Testsysteme und die Erarbeitung entsprechender Online-Versionen und Programme für die Anwendung auf Handhelds und Palmtops erfolgt zur Zeit. Gleichzeitig besteht eine enge Kooperation mit anderen urologischen Kliniken, um eine Anpassung des Programms an die einrichtungsspezifischen Besonderheiten vorzunehmen. Auf der Ebene der Auswertemethoden wird sowohl die umfangreichere Anwendung der Diskordanz-Analyse als auch die Analyse von Subgruppen mit bestimmten Kriterien (z.B. nur Patienten mit fPSA <15% oder nur Gleason 4/5 PCa) eine wichtige Rolle spielen.

Derzeit wird sehr intensiv über eine Überdiagnostik des PCa diskutiert, da eine Mortalitätssenkung bei Patienten mit PSA-Bestimmungen im Vergleich zu Patienten ohne PSA-Bestimmungen bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Die Anwendung von ANN-Ergebnissen zur besseren Selektion von Patienten, für die eine Biopsie unbedingt erforderlich ist, kann wesentlich zur Behebung dieses Problems beitragen. Neben der notwendigen breiten Anwendung von multivariaten Modellen wird nur mit neuen Biomarkern ein tatsächlicher Fortschritt bei der besseren Detektion des behandlungsbedürftigen PCa möglich sein. Ich hoffe, mit meinen Arbeiten und den zukünftigen Projekten dazu beitragen zu können.

8. Danksagung und eidesstattliche Erklärung

Herrn Prof. Dr. Klaus Jung schulde ich für seine dauerhafte Unterstützung seit 1995 den größten Dank. Ohne seine Hilfe und Beratung sowie die Begeisterung für die konsequente wissenschaftliche Arbeit wäre die Durchführung der Studien nicht möglich gewesen. Ich danke ihm sehr für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die stets positive und hochmotivierende Arbeitsatmosphäre. Als Wissenschaftler und Mensch wird Prof. Jung mir immer ein Vorbild sein.

Herrn Prof. Dr. Loening und Herrn Prof. Dr. Schnorr bin ich für die Unterstützung und das stete Interesse bei der Durchführung der Arbeiten sowie die konsequente Förderung der Umsetzung der eigenen Forschungsergebnisse in der klinischen Routine zu großem Dank verpflichtet. Ihre ständige Unterstützung war Voraussetzung, die Experimente im In- und Ausland durchzuführen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank allen Mitarbeitern der Forschungsabteilung unserer Klinik und dort insbesondere Frau Becker, Frau Dr. Jung, Frau Klotzek und Frau Reiche.

Dem seit 1999 stets offenen Kontakt zu Herrn Dr. Cammann aus dem Institut für Biometrie verdanke ich die außerordentlich fruchtbare Kooperation beim Aufbau des ANN. Das online frei verfügbare und nun mittlerweile seit mehr als 3 Jahren nutzbare Programm „ProstataClass“ sowie die bereits zum jetzigen Zeitpunkt geplante Fortführung und Umsetzung vieler ANN-Projekte sind Ausdruck für den unermüdlichen Einsatz von Dr. Cammann, dem an dieser Stelle ein besonderer Dank gilt. Herrn Dr. Meyer, der seit kurzem das „ANN-Team“ mit seinen innovativen Ideen und fleißigen Berechnungen bereichert, gilt ebenso mein Dank.

Als unserem besten internationalen Kooperationspartner und Ideengeber sowie guten Freund bin ich Prof. Dr. Diamandis zu großem Dank verpflichtet. Während meines Aufenthaltes in Toronto (Kanada) war seine gesamte wissenschaftliche Tätigkeit und Wertevermittlung besonders motivierend für mich.

Vom Institut für Pathologie bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Kristiansen für die große Unterstützung und Beteiligung an vielen Studien. Bei den ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie der Charité Frau Dr. Brux und Herrn Prof. Dr. Dr. Sinha bedanke ich mich ebenfalls für die jahrelange Kooperation. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Doktoranden für die engagierte Mitarbeit und bei Herrn Dr. Xu, der sich als Postdoktorand in unserer Forschungsabteilung durch besonderen Fleiß und Einsatz auszeichnete. Ich danke weiterhin allen Koautoren der publizierten Arbeiten. Die Zusammenarbeit spiegelt den Kooperationscharakter wieder.

Mein wesentlicher Dank gilt auch den finanziellen Förderern meiner Arbeiten. Die hier vorgestellten und noch in Bearbeitung befindlichen Studien wurden und werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Deutschen Krebshilfe (Mildred-Scheel-Stiftung) sowie durch verschiedene Stiftungen (Sonnenfeld-Stiftung, Berliner Sparkassenstiftung Medizin, Lieselotte-Beutel-Stiftung, Monika-Kutzner-Stiftung, Boehringer-Ingelheim-Fond) finanziell unterstützt. Dadurch wurde es mir erst möglich, die z.T. kostenaufwendigen Untersuchungen durchzuführen.

An dieser Stelle möchte ich besonders meiner Ehefrau Antje danken. Ohne Ihre Unterstützung und das hohe Maß an Verständnis für die Forschungstätigkeit wären diese hier dargestellten Arbeiten und die Auslandsaufenthalte nicht möglich gewesen. Das positive Umfeld der gesamten Familie und die große Freude mit unserer Tochter Isabel ist und bleibt die Hauptstütze meiner gesamten Tätigkeit.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift