

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

DISSERTATION

Die S100-Proteine S100A8 und S100A9 sowie der Heterodimerkomplex S100A8/A9 im Serum
und Plasma als Marker des Prostatakarzinoms – Untersuchungen zu präanalytischen
Einflussfaktoren und zur diagnostischen Differenzierung zwischen benigner Prostatahyperplasie
und Prostatakarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Stefan Ludwig

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Jung
2. Prof. Dr. med. L. Röcker
3. Prof. Dr. med. R. M. Kuntz

Datum der Promotion: 19.09.2008

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden wie folgt publiziert:

1. Ludwig S, Stephan C, Lein M, Loening SA, Jung K. S100A8, S100A9, and the S100A8/A9 complex in circulating blood are not associated with prostate cancer risk – A re-evaluation study. *Prostate* 2007;67:1301-7.
2. Stephan C, Kramer J, Ludwig S, Jung K, Loening SA. Calprotectin – a highly praised, but unsuitable marker for early detection of prostate cancer – a re-evaluation. Poster: Nordkongress Urologie; Hannover, 3.-5. Mai, 2007.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Prostatakarzinom.....	1
1.1.1.	Epidemiologie	1
1.1.2.	Risikofaktoren	2
1.1.3.	Diagnose.....	2
1.2.	Kalzium-bindende Proteine der S100-Familie	6
1.3.	Die Monomere S100A8 und S100A9	7
1.4.	Das Heterodimer S100A8/A9	7
2.	Aufgabenstellung	12
3.	Material und Methoden	14
3.1.	Untersuchungskollektiv.....	14
3.1.1.	Auswahlkriterien	14
3.1.2.	BPH-Patienten.....	15
3.1.3.	Prostatakarzinom-Patienten ohne Metastasen.....	15
3.1.4.	Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom.....	17
3.1.5.	Patienten zur Ermittlung der Eliminationskinetik.....	17
3.2.	Serum- und Plasmagewinnung.....	18
3.3.	Prinzipien der S100-Protein-Bestimmung	20
3.4.	Spezifität der ELISA-Testsysteme	24
3.5.	Statistische Auswertung	25
4.	Ergebnisse	26
4.1.	Untersuchung zu präanalytischen Einflussgrößen	26
4.1.2.	Einfluss des Untersuchungsmaterials auf die S100-Protein-Konzentration	26
4.1.3.	Einfluss von Frier-Tau-Zyklen auf die S100-Protein-Konzentration	33
4.1.4.	Einfluss unterschiedlicher Lagerungszeiten der Blutproben bei unterschiedlichen Temperaturen auf die S100-Protein-Konzentration	35
4.1.5.	Analytische Zuverlässigkeit der Bestimmung mit verschiedenen Tests.....	38
4.2.	S100-Protein-Konzentrationen in den untersuchten Patientengruppen	40

4.2.1. Patientenselektion: Vermeidung eines sog. Verifikationsfehlers.....	40
4.2.2. S100-Protein-Konzentrationen im Patientenkollektiv	43
4.2.3. Korrelation der S100-Protein-Konzentrationen zu klinischen Parametern.....	47
4.2.4. Bewertung der S100-Protein-Messungen mit Hilfe von ROC-Analysen	52
4.2.5. Verlauf der postoperativen S100-Protein-Konzentration.....	53
5. Diskussion	58
5.1. Präanalytische Einflußgrößen	58
5.2. Diagnostische Validität von S100A8, S100A9 und S100A8/A9-Komplex im Vergleich zu konventionellen PCa-Markern	61
5.3. Eliminationskinetik	63
5.4. Ausblick zur weiteren Entwicklung der Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	64
6. Zusammenfassung.....	69
7. Literaturverzeichnis.....	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
BPH	benigne Prostatahyperplasie
bzw.	beziehungsweise
d.h.	das heißt
DRE	digitale-rektale Untersuchung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
KI	Konfidenzintervall
Max	Maximum
Min	Minimum
Mio.	Millionen
PCa	Prostatakarzinom
PCaM	Prostatakarzinom mit Fernmetastasen
PCaN	Prostatakarzinom mit Lymphknotenmetastasen
PSA	prostataspezifisches Antigen
PV	Probenverdünnung
P-Wert	Signifikanzwert
RT	Raumtemperatur
sog.	so genannter
SD	Standardabweichung
TNM	Stadieneinteilung maligner Tumore: <u>T</u> umor <u>N</u> odus <u>M</u> etastase
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die vorliegende Dissertationsschrift befasst sich mit der Evaluierung eines neuen Biomarkers in der Prostatakarzinomdiagnostik. In den folgenden Kapiteln werde ich daher als Erstes die allgemeinen und spezifischen Hintergründe für das bearbeitete Thema darlegen. Daraus leite ich dann die Fragestellungen ab, die mit den durchgeführten Untersuchungen beantwortet werden sollen. Am Ende dieser Arbeit stelle ich die Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen dar.

1.1. Das Prostatakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom zählt nach den Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und des Robert-Koch-Institutes mit jährlich etwa 48.650 Neuerkrankungen zu den häufigsten Krebserkrankungen des Mannes in Deutschland [1]. Die Erkrankung verursachte allein im Jahr 2005 79.459 Krankenhausbehandlungen mit durchschnittlich 9,1 Belegungstagen [2]. Europaweit wird jährlich mit 2.6 Mio. Neuerkrankungen gerechnet [3]. Dies entspricht 11 % aller männlichen Krebserkrankungen und infolgedessen 9 % aller männlichen Krebstoten in Europa [4]. Deutschland liegt entsprechend der Erkrankungshäufigkeit für das Prostatakarzinom europaweit auf Platz 5 hinter Schweden, Finnland, Belgien und Österreich [1].

Nach den bösartigen Neubildungen der Verdauungs- und Atemorgane verursacht das Prostatakarzinom in Deutschland die dritthöchste Krebssterblichkeit und ist die siebenthäufigste Todesursache beim Mann [5]. 2005 starben 11.203 Patienten an bösartigen Prostataneubildungen [5]. Dies entspricht 10,4 % aller Todesfälle aufgrund von bösartigen Neubildungen [1]. Zieht man in Betracht, dass - vor allem aufgrund der verbesserten Diagnostik - seit Ende der 1980er Jahre ein steiler Anstieg der diagnostizierten Neuerkrankungen zu beobachten ist [6], wird das Prostatakarzinom in den nächsten Jahrzehnten weiterhin ein bedeutender Faktor für das Gesundheitssystem bleiben.

Das Prostatakarzinom ist die Erkrankung des älteren Mannes. So waren in der Bundesrepublik 71,5 % der am Prostatakarzinom erkrankten und 90,8 % der am Prostatakarzinom verstorbenen Patienten 65 Jahre oder älter [2,5]. Bedenkt man, dass die Rate der über 65-Jährigen an der deutschen Gesamtbevölkerung von 19 % im Jahre 2005 auf über 30 % im Jahre 2050, und somit ungefähr 23 Mio. Menschen, ansteigen wird [7], ist in den

nächsten Jahrzehnten mit einem weiteren drastischen Anstieg der Erkrankungshäufigkeit und der Mortalität zu rechnen.

Die American Cancer Society ermittelte für die Vereinigten Staaten ähnliche Zahlen. Für das Jahr 2007 werden dort 218.890 Neuerkrankungen und 27.050 Todesfälle prognostiziert. Damit stellt auch in den USA - wie in Deutschland - das Prostatakarzinom die häufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste krebsassoziierte Todesfolge beim Mann dar [8].

1.1.2. Risikofaktoren

Die meisten Faktoren, die zu einer Erhöhung des Prostatakarzinomrisikos führen, sind zurzeit noch wenig erforscht. Klare Hinweise konnten allein bei erblichen Faktoren gefunden werden. So erhöht sich das Risiko für einen Patienten mit familiärer Vorbelastung, d.h. bei der Erkrankung eines Verwandten ersten Grades, um das Zweifache, bei der Erkrankung von zwei oder mehr Verwandten um das Fünf- bis Elffache [9]. Es wird zudem ein Zusammenhang mit geographischen Faktoren vermutet, der sich an einem nachweisbaren Nord-Südgefälle der Krankheitshäufigkeiten ablesen lässt [10,11]. In diesem Kontext werden auch Einflüsse von exogenen Faktoren, wie Ernährung, diskutiert [12]. Eine positive Korrelation wurde zwischen dem Body mass index (BMI) und dem Auftreten von aggressiven Formen des Prostatakarzinoms und damit verbundener erhöhter Mortalität beobachtet [13]. Hingegen weisen Patienten mit Diabetes Mellitus Typ II ein vermindertes Prostatakarzinomrisiko auf [14].

1.1.3. Diagnose

Da das Prostatakarzinom erst spät durch Symptome wie Schmerzen, Hämaturie, Miktionsstörungen oder Rektuminfiltration klinisch in Erscheinung tritt, sollte eine Diagnose möglichst im asymptomatischen und somit noch organbegrenzten frühen Stadium erfolgen [15]. Da zurzeit klare Daten über den Nutzen einer populationsbasierten Früherkennung fehlen, erfolgt aktuell im klinischen Alltag in Deutschland die Untersuchung auf Vorliegen eines Prostatakarzinoms im Rahmen der Krebsvorsorge ab dem 50. Lebensjahr, bei familiärer Belastung ab dem 45., bis zum Erreichen des 75. Lebensjahres [15]. Aussagekräftige Ergebnisse zum Nutzen und zur Effektivität von breit angelegten Vorsorgeuntersuchungen beim Prostatakarzinom werden erst im Jahr 2008 mit der Auswertung der ERSPC-Studie in Europa und der PLCO-Studie in den USA, zwei zurzeit durchgeführten, großen randomisierten Studien, erwartet [4].

Drei Untersuchungsmethoden spielen in der Diagnose des Prostatakarzinoms eine herausragende Rolle: der Befund nach digitaler-rektaler Untersuchung (DRE), die transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) und die Bestimmung der PSA-Serumkonzentration [16]. Die Diagnosesicherung und die Bestimmung des Tumorgrades erfolgt durch histopathologische Beurteilung des bioptisch gewonnenen Prostatagewebes [4]. Im Folgenden soll auf diese Werkzeuge der Diagnosefindung eingegangen werden.

Die digitale-rektale Untersuchung gilt, trotz widersprechender Ergebnisse hinsichtlich der diagnostischen Aussagekraft, aufgrund der leichten Durchführung und der geringen Invasivität als obligatorisch für die Diagnose und die Einteilung des Prostatakarzinoms [17]. Der positiv-prädiktive Wert liegt in Abhängigkeit vom Serum-PSA-Spiegel im Bereich von 41 (PSA=4-10 µg/l) bis 69 % (PSA >10 µg/l) [4]. Der entscheidende Nachteil dieser Methode besteht in der relativ geringen diagnostischen Sensitivität, das Prostatakarzinom in einem frühen Stadium zu erkennen. Bei auffälligem Tastbefund sind bereits ungefähr 40 bis 70 % der Karzinome über die Organgrenze ausgebreitet [15]. Ein weiterer Nachteil der DRE ist darin zu sehen, dass das Diagnoseergebnis entscheidend von der Erfahrung des Untersuchers bestimmt wird. Außerdem wird durch die Untersuchung oftmals beim Patienten ein Unbehagen hervorgerufen, aus dem eine niedrige Zustimmung für Folgeuntersuchungen resultiert [17,18].

Der transrektale Ultraschall (TRUS) wurde in die Früherkennung eingeführt, um für Prostatakarzinom typische echoarme Gebiete in der Peripherie des Parenchyms ausfindig zu machen [4]. Leider konnte diese Untersuchung die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllen [15]. Es zeigte sich, dass viele Tumore die gleiche Echogenität wie normales Prostatagewebe aufweisen. So zeigten Ellis et al., dass 37,6 % der Prostatakarzinome in im Ultraschall unauffälligem Gewebe gefunden wurden [19]. Somit liegt heute die Hauptaufgabe des TRUS darin, eine sichere und genaue Probenentnahme während einer Stanzbiopsie und eine Bestimmung des Prostatavolumens zu ermöglichen [4].

Das prostataspezifische Antigen (PSA) ist eine fast ausschließlich von Prostataepithelzellen sezernierte Serinprotease [20]. Das PSA gehört zur Familie der humanen Kallikreine, welche inzwischen 15 Mitglieder umfasst. PSA selbst wird in der jetzt verbindlichen Nomenklatur der Kallikreine als Kallikrein 3 bezeichnet. Aufgrund der klinischen Bedeutung dieses Parameters wird aber weiterhin ausschließlich der Name PSA benutzt [21].

Die Einführung des PSA Ende der 80er Jahre als Marker für das Prostatakarzinom revolutionierte die Früherkennung und führte zu einer deutlich häufigeren Diagnose des Prostatakarzinoms in noch organbeschränktem Stadium [22]. In der heutigen Diagnostik gilt eine PSA-Konzentration von über 4 µg/l als Indikator für eine mögliche Krebserkrankung und

bedingt in der Regel eine weiterführende Diagnostik in Form einer stanzbiptischen Untersuchung der Prostata [20]. Im Bereich von 4 bis 9,9 $\mu\text{g/l}$ liegt die Krebswahrscheinlichkeit bei rund 28 %, bei Werten über 10 $\mu\text{g/l}$ schon bei 58 % [23]. PSA-Werte über 20 $\mu\text{g/l}$ weisen einen positiv-prädiktiven Wert von über 80 % auf [24]. Da es sich aber beim PSA um einen zwar organspezifischen, aber nicht krebsspezifischen Marker handelt, zeigten sich in letzter Zeit deutliche Einschränkungen des PSA als Marker zur Differenzierung zwischen malignen und benignen Erkrankungen der Prostata. So werden erhöhte PSA-Konzentrationen auch bei benigner Prostatahyperplasie (BPH), Prostata-Ischämie und Infarkt, akuter und chronischer Prostatitis sowie nach klinischer Manipulation beobachtet [25]. Der im klinischen Alltag akzeptierte PSA-Wert von 4 $\mu\text{g/l}$ führt somit zu 65 % falsch-positiven Befunden [24]. Durch die in den letzten Jahren stark zunehmende Anzahl der PSA-Bestimmungen zeigt sich zudem ein Trend hin zur vermehrten Erfassung von PSA-Konzentrationen unter 10 $\mu\text{g/l}$, wodurch die Aussagekraft des PSA weiter abnimmt [26], da das PSA in diesem Bereich eine nur sehr geringe Korrelation zum Krebsgrad aufweist [27]. Zusätzlich stellen niedrige PSA-Werte zunehmend ein diagnostisches Problem dar, da Untersuchungen zeigten, dass auch PSA-Werte im altersspezifischen Normbereich ein Krebsrisiko von 20 bis 30 % bedeuten können [28-30]. Thompson et al. [31] ermittelten für Patienten zwischen 62 und 91 Jahren mit PSA-Werten zwischen 1,1 bis 4 $\mu\text{g/l}$ eine Prostatakarzinomprävalenz von 17 bis 26 %. Bei Werten >10 $\mu\text{g/l}$ ist hingegen bei 50 % der Patienten schon eine fortgeschrittene und somit prognostisch ungünstigere Erkrankung zu erwarten [24]. Aus diesen Untersuchungen heraus erklären sich die Überlegungen, Prostatabiopsien schon ab einer niedrigeren PSA-Konzentration durchzuführen, um die Diagnose des Prostatakarzinoms möglichst früh zu sichern [32]. Diese Ergebnisse verdeutlichen aber zudem die Notwendigkeit, nach neuen, spezifischen Markern für das Prostatakarzinom in der so genannten „Grau-Zone“ des PSA von 2 bis 10 $\mu\text{g/l}$ zu suchen, um besser zwischen malignen und benignen Erkrankungen unterscheiden zu können [20,26]. Trotz der genannten Einschränkungen ergibt die PSA-Bestimmung eine bessere Voraussagemöglichkeit als DRE oder TRUS [33]. Werden hingegen die einzelnen Methoden kombiniert, insbesondere die PSA-Bestimmung und die digital-rektale Tastuntersuchung, so steigt der positiv-prädiktive Wert auf bis zu 80 Prozent an [4].

Auf der Suche nach verbesserten Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen malignen und benignen Prostataerkrankungen konzentrieren sich neuere Untersuchungen auf unterschiedliche molekulare Formen des PSA. Als vielversprechend hat sich hierbei das so genannte freie PSA (fPSA) erwiesen. Es ermöglicht zwar allein keine diagnostische Verbesserung, aber in Kombination mit der Gesamt-PSA-Konzentration (tPSA) ergibt sich durch die Berechnung der

PSA-Ratio (%fPSA), d.h. des Verhältnisses von freiem zu totalem PSA, eine deutlich bessere Differenzierungsmöglichkeit [24]. Dies gilt besonders für den tPSA-Bereich bis 10 µg/l [34]. In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass die Spezifität im Vergleich zur tPSA-Konzentration im Bereich von 4 bis 10 µg/l von 18 auf 55 % verbessert werden konnte [35-37]. Eine Biopsie könnte somit in vielen Fällen vermieden werden. Dies würde dem Patienten eine nicht-invasive Maßnahme ersparen und eine erhebliche Kostenreduktion bedeuten.

Für die Früherkennung des Prostatakarzinoms im Bereich von PSA-Werten zwischen 2.6 bis 4 µg/l deutet sich für die PSA-Ratio ein weiteres Einsatzgebiet an. So zeigten Catalona et al. [38] bei normaler DRE und einem Diskriminationswert des %fPSA von 27 % eine PCa-Entdeckungswahrscheinlichkeit von 90 %. Durch mehrere multizentrische Studien sind die Bestimmung der fPSA-Konzentration und die Berechnung der PSA-Ratio inzwischen gut in der klinischen Diagnostik etabliert. Vor allem in der Kombination mit anderen Markern und in der Einbindung in artifizielle neuronale Netzwerke (ANN) wird in der Zukunft eine bessere Möglichkeit erwartet, das individuelle Prostatakarzinomrisiko für Patienten einzuschätzen und unnötige Biopsien zu vermeiden [24].

Neuere Untersuchungen konzentrieren sich zudem auf das humane Kallikrein 2 (hK2), ein mit dem PSA in 78 % der Aminosäuren übereinstimmendes Mitglied der Serinprotease-Familie [24]. Kwiatkowski et al. [39] konnten als erste eine verbesserte Unterscheidung zwischen benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom im PSA-Bereich von 4 bis 10 µg/l mit Hilfe der hK2/fPSA-Ratio zeigen. Diese Befunde wurden in weiteren Untersuchungen bestätigt [40,41].

Neben den Untersuchungen zu diesen beiden schon sehr gut verstandenen Markern für das Prostatakarzinom beschäftigt sich die neuere Forschung mit einer Reihe von weiteren PSA-Subformen und anderen möglichen diagnostischen Markern. Neben Untersuchungen zu den verschiedenen pro-PSA-Formen und dem BPSA, der PSA-Form der benignen Prostatahyperplasie [26], werden Prohormone wie GRN-A, die Gluthation Transferase GSTP1 und Oberflächen- und Zellmembranproteine wie PSCA und PSMA auf ihre diagnostischen Möglichkeiten hin untersucht [20]. Für diese neueren Marker lassen sich aber, vor allem aufgrund von schwierigen, kostenintensiven und langwierigen Nachweisverfahren, noch keine mit der fPSA-Ratio und dem humanen Kallikrein 2 vergleichbare Ergebnisse aufweisen [20].

Kürzlich haben Hermani et al. [42] den Zusammenhang von S100A8 und S100A9 - das sind Proteine aus der Familie der Kalzium-bindenden S100-Proteine - mit der Tumorgenese des Prostatakarzinoms untersucht und deren mögliche Anwendung als Prostatakarzinom-Marker beschrieben. Im Folgenden werde ich auf die S100-Proteine näher eingehen, da sich die

Aufgabenstellung dieser Dissertationsschrift auf die Anwendung dieser Proteine im Vergleich zu den bekannten und etablierten Markern tPSA und %fPSA konzentriert.

1.2. Kalzium-bindende Proteine der S100-Familie

Die Familie der S100-Proteine ist eine wirbeltierspezifische Proteinklasse [43]. Sie stellt die größte Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine im menschlichen Organismus dar [44]. Charakteristisch für sie sind zwei spezifische Domänen, die beiden so genannten EF-Hand-Motive. Diese dienen der Aufnahme von Kalzium [45], wobei die Bindung zu einer Konformationsänderung des Proteins führt [44]. Durchschnittlich besitzen die Proteine dieser Familie eine Größe von 10-12 kDa und liegen intrazellulär als nicht-kovalent aneinander gebundene Homo- oder Heterodimere vor [43,44]. Diese Eigenschaft scheint eine essenzielle Bedeutung für ihre jeweilige biologische Funktion zu haben [44,46].

Die physiologische Aufgabe der S100-Proteine wird heute noch nicht genau verstanden. Da aber Kalzium als ubiquitär in allen Zellen vorkommendes Element eine wichtige Rolle als so genannter „Second Messenger“ spielt, kommt den S100-Proteinen vermutlich eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion der Zelle zu [47,48]. Es besteht Konsens, dass die S100-Proteine intrazellulär die Aktivität von Effektorproteinen beeinflussen. Den S100-Proteinen werden zahlreiche intra- und extrazelluläre Funktionen zugeschrieben, wie z.B. Aufgaben bei der Proteinphosphorylierung, der Enzymaktivierung, der Regulation der Kalziumhomöostase sowie trophische Effekte am zentralen Nervensystem [43,45]. Sie scheinen zudem am Zellwachstum, der Zelldifferenzierung, der Regulation der Zellmotilität, der Transkription sowie der Regulation des Zellzyklus beteiligt zu sein [43,49].

In jüngster Zeit haben Untersuchungen gezeigt, dass S100-Proteine eine wichtige Rolle in der Pathogenese von epidermalen Erkrankungen spielen und dass Änderungen im Expressionsmuster dieser Proteine einen Schritt in der Entwicklung von epithelialen Tumoren darstellen [50]. S100-Proteine haben sich in einzelnen Untersuchungen als prognostische Indikatoren bei gastrointestinalen, Larynx-, Ösophagus-, Mammakarzinomen und Melanomen erwiesen und sind hilfreich in der Differenzierung von Astrozytomen und Glioblastomen [44]. Sie wurden außerdem bisher in der Diagnostik von hypoxischen Hirnschäden, akutem Myokardinfarkt und amyotropher Lateralsklerose eingesetzt [44].

1.3. Die Monomere S100A8 und S100A9

Die S100-Proteine S100A8 und S100A9 werden vor allem von myelomonocytyischen Zellen exprimiert und tendieren in vivo zur Homo- und Heterokomplexbildung [44]. Die Expression der beiden Proteine scheint auf die frühe Differenzierungsphase der myeloiden Zellen beschränkt zu sein, da sie vor allem in zirkulierenden Granulozyten und Monozyten, nicht aber in Gewebsmakrophagen nachgewiesen werden können [45]. Untersuchungen zeigen eine Co-Expression der beiden Proteine, so dass man von einem gemeinsamen Mechanismus der Regulation der Transkription ausgehen kann [51]. In-vitro-Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass die Transkription der beiden Monomere stark durch pro-inflammatorische Cytokine wie TNF- α und Interleukin-1 induziert wird [50]. Die S100A8- und S100A9-Expression korreliert dabei mit der Aktivität von Entzündungsreaktionen [50]. Man kann daher von einer gewichtigen Rolle von S100A8 und S100A9 im angeborenen unspezifischen Immunsystem ausgehen [45,52].

Aufgrund der Homo- und Heterokomplexbildung dieser beiden Proteine fällt es schwer, genaue Angaben über die spezifischen Funktionen der Monomere zu treffen. Über S100A9 ist bekannt, dass es die höchste Zinkbindungskapazität aller S100-Proteine aufweist und dass erhöhte S100A9-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Diabetes mellitus Typ I gemessen wurden [53,54]. S100A8 ist in seiner nicht-oxidierten Form ein stark chemotaktisch wirkendes Agens für Leukozyten. Damit wird die Bedeutung dieses Proteins im Entzündungsgeschehen unterstrichen [55]. Untersuchungen zur Deletion des S100A8-Genes im Mausmodell führten zu der Annahme, dass S100A8 eine Rolle in der Prävention der maternalen Abstoßungsreaktion des implantierten Embryos spielen könnte [56]. Andererseits wurde es mit einer Stimulation der HIV-Replikation in Zusammenhang gebracht. Eine S100A8-Blockierung im vaginalen Sekret könnte eine Möglichkeit bieten, das Risiko einer sexuellen Übertragung des Erregers sowie die Übertragung von HIV von der Mutter auf den Embryo zu verringern [44].

Es existieren zahlreiche weitere Beschreibungen zu den Funktionen von S100A8 und S100A9. Doch da diese meist im Zusammenhang mit dem von den beiden Monomeren gebildeten Heterokomplex stehen, möchte ich auf diese im nächsten Abschnitt eingehen.

1.4. Das Heterodimer S100A8/A9

S100A8/A9, auch bekannt als Calprotectin, es ist ein vielseitig biologisch aktives Molekül [45]. Es ist ein Heterodimer, das auch als Tetramer auftreten kann und sich aus den

oben beschriebenen Monomeren S100A8 und S100A9 zusammensetzt [57,58]. Die biologische Funktion scheint vor allem in einer antimikrobiellen und antiproliferativen Aktivität und der Regulation von inflammatorischen Prozessen zu liegen [59-62]. Erhöhte S100A8/A9-Konzentrationen wurden während der Akut-Phase-Reaktion nachgewiesen [63]. Nach den Untersuchungen von Sanders et al. [63] besteht jedoch nur eine geringe Korrelation zwischen S100A8/A9 und der CRP-, ESR- und Leukozyten-Konzentration. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass S100A8/A9 an einem separaten Aspekt der Entzündungsreaktion beteiligt ist [63]. Die höchsten Anstiege der S100A8/A9-Konzentration wurden bei zystischer Fibrose, rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und ulzerativer Colitis sowie bakteriellen Infektionen beobachtet [52].

S100A8/A9 ist ein Protein mit vielen verschiedenen Namen. Die Bezeichnung Calprotectin erlaubt jedoch eine gute Beschreibung für seine Kalzium bindenden Fähigkeiten zum einen und seine protektive Funktion zum anderen [52]. 1973 wurde es zum ersten Mal von Wilson et al. [64] unter dem Namen „Cystic Fibrosis associated Antigen“ beschrieben. 1988 charakterisierten Wilinon et al. [65] es weiter und schlugen den Namen Calgranulin vor. 1980 wurde S100A8/A9 durch Fagerhol et al. [52] zum ersten Mal aus Granulozyten isoliert und als „L1 Protein“ bezeichnet. 1987 beschrieben Odink et al. [66] die mit MIF verwandten Proteine MRP8 und MRP14 und den von ihnen gebildeten Heterokomplex. Die Verbindung zwischen all diesen beschriebenen Stoffen konnte erst 1988 mit Hilfe von cDNA-Sequenzierungen und immunhistochemischen Färbungen hergestellt werden [67,68].

Die Gene für die Monomere des 36 kDa schweren S100A8/A9 sind auf dem Chromosom 1, q12-q21 lokalisiert [67,68]. Die Bildung des Heterodimers scheint, anders als bei den meisten Mitgliedern der S100-Protein-Familie, kalziumunabhängig zu erfolgen [69]. Unter Kalziumbindung bildet es den Heterokomplex (S100A8/A9)₂ aus, wobei jedes der Tetramere 8 Kalzium-Ionen bindet [69]. Durch die Bindung von Kalzium erfolgt wie bei allen S100-Proteinen eine Konformationsänderung. Dadurch wird das Protein stabil gegenüber Hitze und Proteolyse [70]. Zudem enthält es auf den S100A8- und S100A9-Ketten jeweils das so genannte HEXXH-Motiv, eine kalziumunabhängige Zinkbindungsstelle, welche eine bedeutende Funktion in der antimikrobiellen Aktivität des Proteins innehat [71,72].

Obwohl S100A8/A9 in fast allen Zellen, Gewebearten und Flüssigkeiten des menschlichen Körpers vorkommt, ist es vor allem ein myelomonocytisches und keratinocytisches Protein. Es liegt daher vor allem in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sowie in Keratinozyten vor [52]. In neutrophilen Granulozyten macht es ~5 % der totalen Proteinmasse und 50-60 % des löslichen Inhalts des Zytosols aus [53,73].

Die bekannten Funktionen von S100A8/A9 sind, wie bei allen S100-Proteinen, zahlreich. Intrazellulär kann es eine kalziumabhängige Beziehung mit dem Zytoskelett der Zelle eingehen [74]. Es spielt somit offensichtlich eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion [74,75]. Durch eine Modulation der Kasein-Kinase II und der Topoisomerase kann S100A8/A9 zudem auf die Zellproliferation einwirken [52].

S100A8/A9 enthaltende Phagozyten sind meist die Ersten am Ort einer Entzündung. Die durch den intrazellulären Kalziumanstieg ausgelöste S100A8/A9-Assoziation mit dem Zytoskelett und der Zellmembran erlaubt eine Neuordnung der Zellstruktur und die Zellmigration [76,77]. Die transendotheliale Migration der Phagozyten wird hierbei durch die S100A8/A9-Stimulation von intrazellulären Adhäsionsmolekülen wie z.B. ICAM-1 moduliert [78,79]. S100A8/A9 wird höchstwahrscheinlich aktiv durch Monozyten und Granulozyten sezerniert, wobei für die Granulozyten ein Tubulin-abhängiger Mechanismus nachgewiesen werden konnte [80]. Extrazellulär wirkt es vermutlich, wie für andere Mitglieder der S100 Familie gezeigt, am RAGE (receptor for advanced glycation end products), einem Multiliganden-Rezeptor aus der Familie der Immunglobuline, der weit im Gewebe verbreitet ist [81,82].

Die antimikrobielle Aktivität von S100A8/A9 erklärt sich vor allem durch die Bindung von Zink, womit dieses Element den darauf angewiesenen Mikroorganismen entzogen und diese geschädigt werden [53]. Weitere Studien zeigten für S100A8/A9 eine Anti-Candida-Albicans-Aktivität, zytokinähnliche Effekte und eine chemotaktische Aktivität, sowie eine Stimulation der Immunglobulinproduktion [83,84]. Hohe S100A8/A9-Konzentrationen scheinen zudem die Zellproliferation zu inhibieren und Apoptose zu induzieren [53,83].

Die klinische Relevanz von S100A8/A9 wurde bis jetzt in einer Vielzahl von Studien untersucht. Sanders et al. [63] beschrieben bereits 1984 erhöhte S100A8/A9-Konzentrationen bei bakteriellen Infektionen, nicht infektiösen entzündlichen Prozessen und malignen Erkrankungen. Erhöhte Konzentrationen in Serum und Plasma wurden für aktive rheumatische Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, juvenile rheumatoide Arthritis und Lupus erythematoses beschrieben, wobei S100A8/A9 ein Parameter für die Krankheitsaktivität und das Ansprechen auf die Therapie zu sein scheint [52,85]. Bei chronischen Verläufen der rheumatoiden Arthritis scheint die S100A8/A9-Konzentration die Krankheitsaktivität besser anzeigen zu können als das CRP [86,87]. Die Bestimmung in der Synovialflüssigkeit kann zudem als Marker der örtlichen Entzündung dienen [45].

Bei der zystischen Fibrose wird S100A8/A9 als Entzündungsparameter verwendet. Zurzeit ist jedoch noch unklar, ob die erhöhte Konzentration Ausdruck der bronchialen

Entzündung oder der generellen Immunabberation ist [52]. Bei HIV-Infektionen scheint S100A8/A9 Bedeutung als Infektionsmarker zu haben [88,89]. Ein Anstieg der S100A8/A9-Konzentration nach Zidovudin-Gabe wird bei HIV-Patienten als ein prognostisch günstiges Zeichen gewertet [52]. Eine erhöhte S100A8/A9-Expression wurde im Gewebe von Magen- und Mammakarzinomen gefunden [90]. Außerdem wurde S100A8/A9 als prognostischer Marker bei alkoholisch induzierter Leberzirrhose und als prädiktiver Marker für Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantationen beschrieben [52,90,91].

Ein Stuhltest für chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit einer starken Korrelation zwischen der ermittelten S100A8/A9-Konzentration und dem histologischen Ergebnis wurde in den letzten Jahren eingeführt [92-96]. Zwar ist S100A8/A9 nicht spezifisch für eine der Krankheitsentitäten und zeigt starke Schwankungen zwischen einzelnen Patienten, es kann aber auch bei klinisch unauffälliger Untersuchung einen entzündlichen Vorgang anzeigen [97,98]. Als Hypothese für die erhöhten S100A8/A9-Konzentrationen im Stuhl bei intestinalen Erkrankungen wird angenommen, dass sich aufgrund der pathologischen Veränderungen des Magen-Darm-Traktes die Permeabilität der intestinalen Mukosa erhöht und somit vermehrt Granulozyten und Monozyten migrieren [52].

Eine neue Krankheitsentität, die weiteres Licht auf die Funktion von S100A8/A9 werfen könnte, wurde durch Sampson et al. [53] im November 2002 beschrieben. Die untersuchten Patienten präsentierten neben einer Hyperzinkämie eine Hypercalprotectinämie mit Arthritis, Hepatosplenomegalie und hohen CRP-Konzentrationen. Es wird davon ausgegangen, dass die klinischen Bilder am ehesten mit der durch die hohe S100A8/A9-Konzentration inhibierten Zellproliferation und induzierten Apoptose zu erklären sind [53]. Somit kann vermutet werden, dass pathologisch hohe S100A8/A9-Konzentrationen eine unkontrollierte und schädliche entzündliche Reaktion auslösen [53].

Ausgehend von Untersuchungen zur Überexpression von S100-Proteinen bei epithelialen Neoplasien haben neuere Studien eine erhöhte S100A8- und S100A9-Expression bei hepatozellulären Karzinomen, pulmonalen Adenokarzinomen, Magen- und Mammakarzinomen nachgewiesen [99-101]. Es wird zudem kontrovers diskutiert, ob S100A8/A9 als möglicher Stuhlmarker für intestinale Malignome einsetzbar ist [52,102-104]. Hermani et al. [42] zeigten in ihrer Studie eine erhöhte S100A8- und S100A9-Expression in PIN- und Prostatakarzinomgewebe. Sie postulierten zudem die Möglichkeit, dass S100-Proteine als diagnostische Marker in der Prostatakarzinomdiagnostik einsetzbar sind. Ausgehend von diesen Studien war es das Ziel dieser Arbeit, diese viel versprechenden Ergebnissen mit einem größeren Studienkollektiv kritisch zu reevaluieren und zu untersuchen, ob sich diese S100-Proteine neben

den etablierten Verfahren als neue diagnostische Marker in der Prostatakarzinomdiagnostik einsetzen lassen.

2. Aufgabenstellung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde die Bedeutung der S100-Proteine S100A8 und S100A9 sowie des von ihnen gebildeten Heterodimers S100A8/A9 als Marker von malignen Prozessen im Organismus überwiegend an Expressionsmustern in entnommenen Gewebeproben untersucht. Bis auf eine Arbeit zur Konzentration dieser S100-Proteine im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom [105] und der Arbeit von Hermani et al. [42] gibt es nach meinen Literaturrecherchen keine weiteren Berichte, die sich spezifisch mit der Expression beider Monomere und des von ihnen gebildeten Heterodimers im zirkulierenden Blut von Karzinompatienten beschäftigen. Sollte jedoch gezeigt werden, dass sich diese Proteine als Marker maligner Prozesse eignen, ergibt sich daraus die Perspektive, ihre Bestimmung im Zuge nicht-invasiver Screening-Tests einzusetzen.

Hermani et al. bestimmten in ihrer Arbeit, ausgehend von der durch sie gefundenen erhöhten S100A8- und S100A9-Expression im malignen Prostatagewebe, allein die S100A9-Serumkonzentration [42]. Da jedoch zahlreiche Studien die Tendenz zur Heterokomplexbildung mit S100A8 belegen [44,69] und dieser Komplex als wesentlich stabiler als die einzelnen Monomere angesehen wird [52], entschloss ich mich zur Bestimmung nicht nur beider Monomere, sondern auch des durch sie gebildeten Heterokomplexes.

Zur Beurteilung der diagnostischen Aussagekraft der S100A9-Serumkonzentration beim Prostatakarzinom verwendeten Hermani et al. nur die PSA-Konzentration der von ihnen untersuchten Patienten [42]. Der Marker %fPSA, der in Kombination mit der tPSA-Konzentration die Prostatakarzinomdiagnostik nachweislich verbessert [24,34], wurde nicht in ihrer Studie eingesetzt. Dies widerspricht dem allgemeinen Prinzip, neue Biomarker immer mit den zurzeit besten Markern für die jeweilige Fragestellung zu vergleichen [106]. Ausgehend von diesem Prinzip bestimmte ich in dieser Studie nicht nur die tPSA-Konzentration, sondern verglich die diagnostische Validität der S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentration mit den %fPSA-Werten.

Zu Beginn dieser Arbeit war zudem die Datenlage in Bezug auf die von uns verwendeten ELISA-Testsysteme hinsichtlich des zu verwendenden Probenmaterials unzureichend. Da die S100-Proteine, wie oben beschrieben, in weißen Blutzellen vermehrt vorkommen, war anzunehmen, dass die Art der Blutprobengewinnung und das eingesetzte Probenmaterial (Serum, Plasma) wichtige präanalytische Einflussfaktoren sein könnten, die über klinische Aussagekraft

entscheiden. Um somit mögliche Fehlerquellen auszuschließen, mussten umfangreiche Voruntersuchungen vorgenommen werden.

Die Aufgabe der Arbeit lässt sich infolgedessen in die folgenden Abschnitte gliedern:

1. Untersuchungen zur Beeinflussung der S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen durch die verschiedenen präanalytischen Einflussgrößen der Probengewinnung.
2. Bestimmung der S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen an einer größeren Studiengruppe von Prostatakarzinompatienten und Patienten mit benigner Prostatahyperplasie in Probenmaterialien, die sich aus den unter Punkt 1 abgeleiteten Bedingungen als notwendig erweisen.
3. Vergleich der diagnostischen Validität dieser neuen Marker mit der tPSA-Konzentration und dem %fPSA-Wert sowie Einschätzung der Beziehung zum Tumorstadium, dem Tumordifferenzierungsgrad und anderen klinischen Parametern.
4. Untersuchungen zur Assoziation dieser Proteine mit der Prostata durch Untersuchungen zur Eliminationskinetik nach radikaler Prostatektomie.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungskollektiv

Für die Untersuchungen im Rahmen der Präanalytik, bei denen verschiedene Einflussgrößen auf die Konzentrationen der Einzelproteine S100A8 und S100A9 sowie des Komplexes S100A8/A9 überprüft werden sollten, stellten sich insgesamt 5 gesunde männliche und 5 gesunde weibliche Probanden zur Verfügung. Bei ihnen handelte es sich um Mitarbeiter der Klinik für Urologie der Charité, CCM, deren Alter zwischen 25 und 63 Jahren (Altersmedian: 36 Jahre) lag. Der anschließende Vergleich zwischen Patienten mit Prostatakarzinom bzw. benigner Prostatahyperplasie (BPH) erfolgte an Hand der Blutproben von insgesamt 140 Patienten, die in der Urologischen Klinik oder Poliklinik der Charité, Campus Mitte, im Zeitraum vom Oktober 2000 bis Mai 2004 in stationärer oder ambulanter Behandlung waren. Dabei handelte es sich um 50 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH), 50 Patienten mit Prostatakarzinom ohne Metastasen (T1-3 pN0M0) sowie 40 Patienten mit metastasiertem Karzinom der Prostata. Von den metastasierten Patienten wiesen 27 Lymphknotenmetastasen und 13 Fernmetastasen (ossär metastasiert: n=12; hepatisch und pulmonal metastasiert: n=1) auf.

Für die abschließende Analyse des postoperativen Verlaufs der S100-Proteinkonzentration wurden die Blutproben von 10 Patienten untersucht, welche sich im Zeitraum vom Mai bis November 2006 an der Urologischen Klinik der Charité einer Operation unterzogen hatten. Von diesen Patienten waren 6 an einem Prostatakarzinom und 4 an einem Nierenzellkarzinom erkrankt.

Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen des von der Ethikkommission genehmigten Projektes "Neue Serummarker in einem artifiziellen neuronalen Netzwerk zur Optimierung der Prostatabiopsieindikation" (Deutsche Krebshilfe, Reg.Nr. 70-3295).

3.1.1. Auswahlkriterien

Als Einschlusskriterium für die Patienten mit benigner Prostatahyperplasie und nicht-metastasiertem Prostatakarzinom galt, neben der histologisch gesicherten Diagnose, ein t-PSA-Wert von $<20 \mu\text{g/l}$. Dabei wurde darauf geachtet, für jeden Patienten des einen Kollektivs jeweils einen anderen mit annähernd gleichem t-PSA in die Studie einzuschließen, um damit

eine Unterscheidung allein durch den t-PSA Wert zu verhindern [107]. Für jeden dieser Patienten musste zudem ein Wert für das freie PSA (fPSA) und somit die PSA-Ratio (%fPSA) vorliegen.

Als Ausschlusskriterien für die Patienten galten akute und alle nicht-infektiösen, chronisch-entzündlichen Erkrankungen in der Vorgeschichte, die zu einer Erhöhung der S100-Protein-Konzentration führen könnten. Dazu zählen rheumatoide, psoriatische, reaktive und juvenile idiopathische Arthritis, zystische Fibrose, chronisch entzündliche Lungen- und Darmerkrankungen, wie M. Crohn und Colitis ulcerosa [45] sowie Diabetes Typ I [54]. Eine erniedrigte Calprotectin-Konzentration wurde für virale Lebererkrankungen nachgewiesen [108], weswegen dieser Erkrankungskreis auch als Ausschlusskriterium galt. Als Anhaltspunkt für ein Vorhandensein von Erkrankungen aus diesem Formenkreis wurden die Krankenakten mit den entsprechenden aktuellen Laborbefunden (Blutbild, Enzymbestimmung) ausgewertet.

3.1.2. BPH-Patienten

Die 50 in die Studie eingeschlossenen BPH-Patienten zeigten eine Altersverteilung von 54 bis 83 Jahren mit einem Altersmedian von 68 Jahren. Die Diagnosestellung erfolgte nach anamnestischem Verdacht durch die transrektale Palpation (vergrößerter, gut abgrenzbarer, homogener, indolenter Drüsenkörper mit verstrichenem Sulcus medialis), den transrektalen Ultraschall (vergrößerter, homogener, symmetrischer Drüsenkörper, keine echoarmen Bezirke nachweisbar) und den PSA-Wert. Bei allen Patienten erfolgte zudem eine histologische Sicherung der Diagnose durch eine histopathologische Untersuchung des durch Biopsie, transurethrale Resektion oder Adenomektomie gewonnenen Gewebes.

3.1.3. Prostatakarzinom-Patienten ohne Metastasen

Die 50 in die Studie eingeschlossenen Prostatakarzinom-Patienten (T1-3 pN0 M0) wiesen eine Altersverteilung von 44 bis 79 Jahren mit einem Altersmedian von 64 Jahren auf. Die Diagnosestellung erfolgte bei allen Patienten durch eine histopathologische Untersuchung des durch Stanzbiopsie und/oder radikale Prostatektomie gewonnenen Gewebes. Die Tumorstadieneinteilung erfolgte auf der Grundlage des TNM-Systems [109]. Die Tabelle 1 bietet einen Überblick über die Stadienverteilung der untersuchten Patienten. Der Differenzierungsgrad des Tumors wurde anhand der „Gleason-Grade“-Skala entsprechend des in Tabelle 2 zusammengestellten Schemas bewertet [110]. Hierbei werden im histologischen Bild

die Zellen der beiden größten Karzinomgebiete in 5 Stufen eingeteilt. Der Grad 1 definiert die am wenigsten aggressive, der Grad 5 die aggressivste Tumorform. Die beiden Werte des Gleason-Grades werden zum so genannten „Gleason-Score“ zusammengezogen. Ein Wert von 2 bis 4 stellt einen prognostisch günstigen, ein Wert von 8 bis 10 einen prognostisch eher ungünstigen Malignitätsgrad dar. Die Tabelle-3 zeigt die Aufteilung der Patienten nach individuellem Gleason-Grad und Gleason-Score.

Tabelle 1. Übersicht zur Stadienverteilung der untersuchten Prostatakarzinompatienten (n=50) nach der TNM-Klassifikation

<u>TNM</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Anzahl der Patienten</u>
pT1	inzidentelles Karzinom, klinisch nicht erkennbar	0
pT1a	< 5 % des resizierten Gewebes	1
pT1b	> 5 % des resizierten Gewebes	0
pT1c	Tumor durch Biopsie diagnostiziert bei z.B. erhöhtem PSA	2
pT2	Tumor begrenzt auf Prostata	1
pT2a	Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappens oder weniger	9
pT2b	Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappens	13
pT2c	Tumor infiltriert beide Lappen	4
pT3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel	6
pT3a	extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig)	10
pT3b	Tumor infiltriert die Samenblase(n)	4
pT4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Blasenhals, Sphinkter externus, Rektum, Levator-Muskulatur, Beckenwand)	0

Tabelle 2. Beschreibung der histologischen Differenzierung des Prostatakarzinoms nach Gleason et al. [110]

<u>Gleason-Grad</u>	<u>Beschreibung</u>
1 & 2	Tumordrüsen gleichmäßig, rund, hellzellig. Abstand zwischen ihnen gleichmäßig, dicht gelagert
3	Tumordrüsen unregelmäßig gezackt, länglich. Abstand unregelmäßig, ohne Fusion.
4	Fusion von mind. 4 Tumordrüsen. Muster: unscharf begrenzt, infiltrativ, unregelmäßiges Lumen (kribriforme Muster)
5	kribriforme Muster mit Komedonennekrose, solid-anaplastisch, Siegelringzellkarzinom, kleinzell. oder sarkomatoides Karzinom

Tabelle 3. Übersicht der untersuchten Prostatakarzinompatienten (n=50) nach dem Gleason-Grad und Gleason-Score

<u>Gleason-Grad</u>	<u>Patientenanzahl</u>	<u>Gleason Score</u>	<u>Patientenanzahl</u>
1 + 2	1	3	1
2 + 2	2	4	2
2 + 3	8	5	10
3 + 2	2		
3 + 3	12	6	12
3 + 4	16	7	21
4 + 3	5		
4 + 4	1	8	2
5 + 3	1		
4 + 5	1	9	2
5 + 4	1		

3.1.4. Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom

Es wurden 40 Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom in die Studie eingeschlossen. Dabei wurde unterschieden zwischen Metastasen der Lymphknoten (n=27; pT1-3N1M0, Altersbereich 51 bis 74; Altersmedian 66 Jahre) und Fernmetastasen (n=13; pT2-4, N0-1M1, Altersbereich 60 bis 80; Altersmedian 66 Jahre). Es handelte sich um 38 Patienten mit primärem Prostatakarzinom, wobei fünf Patienten vor der Blutentnahme bereits einer Hormontherapie unterlagen (2 Patienten für 2 Wochen, 1 Patient für 3 Monate, 1 Patient für 2 Jahre, 1 Patient für 3 Jahre), einen Patienten mit Karzinomrezidiv nach Strahlenbehandlung und einen Patienten mit Strahlenbehandlung und Hormontherapie. Die Diagnosestellung der Lymphknotenmetastasierung erfolgte durch einen positiven histopathologischen Befund nach Lymphadenektomie. Patienten mit Knochen- oder anderen Fernmetastasen wurden aufgrund eines auffälligen radiologischen Befundes (Skelettszintigraphie, Röntgenbefund) diagnostiziert.

3.1.5. Patienten zur Ermittlung der Eliminationskinetik

Es wurden 6 an einem Prostatakarzinom erkrankte Patienten in die Untersuchung des postoperativen S100-Protein-Verlaufs eingeschlossen. Bei allen Patienten erfolgte eine radikale, laparoskopische Entfernung des erkrankten Organs mit anschließender histopathologischer Untersuchung des gewonnenen Gewebes. Die Patienten zeigten eine Altersverteilung von 48 bis 69 Jahren, mit einem Altersmedian von 60 Jahren. Die histopathologischen Beurteilungen ergaben

ein Tumorstadium von pT2a und pT2b bei jeweils einem Patienten, die restlichen vier Patienten zeigten ein pT2c Stadium. Drei der Patienten zeigten einen Gleason-Grad von 3+4, die restlichen jeweils 3+3, 3+5 und 4+3. Daraus ergab sich ein Gleason-Score von 7 bei vier der Patienten sowie ein Score von 6 und 8 bei jeweils einem.

Als Referenzkollektiv zu den Prostatakarzinompatienten wurden 4 Patienten mit einem Nierenzellkarzinom in die Studie einbezogen, welche aufgrund ihrer Erkrankung in unserer Klinik nephrektomiert wurden. Dies geschah entweder laparoskopisch (n=2) oder offen (n=2). Das Gewebe wurde histopathologisch beurteilt, und es ergaben sich Tumorstadien von pT1a (n=1), pT3a (n=2) und pT3c (n=1). Die Tumore waren mäßig (G2, n=3) bis schlecht (G3, n=1) differenziert. Bei zwei der Patienten wurde eine zerebrale bzw. ossäre Metastasierung festgestellt. Die Patienten zeigten eine Altersverteilung von 49 bis 80 Jahren.

Zur Ermittlung der S100-Protein-Eliminationskinetik wurde bei jedem Patienten jeweils prä-, intra- und postoperativ Blut entnommen. Intraoperativ erfolgten sie zum Zeitpunkt der Organentnahme (t=0 h), postoperativ wurden 2, 5, 24 und 72 h nach Organentnahme jeweils weitere Blutproben entnommen.

3.2. Serum- und Plasmagewinnung

Für die Versuche zum präanalytischen Teil dieser Arbeit erfolgte die Probengewinnung durch Venenpunktion nach maximal einminütiger Venenstauung mit Hilfe von Entnahmesystemen der Firma Sarstedt®. Es wurden, abhängig vom Versuchsdesign, verschiedene Systeme zur Gewinnung von Serum und Plasma verwendet. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Gesamtheit der verwendeten Monovetten. Sie alle bestehen aus dem Kunststoff Polypropylen (PP).

Tabelle 4. Verwendete Monovetten-Entnahmesysteme der Firma Sarstedt® zur Gewinnung von Serum und Plasma

Monovette	Volumen (ml)	Beschichtung / Zusatz	Probenmaterial	Kurzbezeichnung
02.1726.001	9	ohne Beschichtung / Zusatz	Serum	S-
01. 1601	7,5	gerinnungsförderndes Kunststoffgranulat	Serum	S+
3.1628	5,5	Heparinbeschichtung (16 I.E. Heparin/ml Blut)	Plasma	LiH
01.1605.001	7,5	K-EDTA-Beschichtung (1,6 mg EDTA/ml Blut)	Plasma	KEDTA
5.1071	5	Natriumcitrat-Beschichtung (0,106 mol/l)	Plasma	Citrat

Nach der Blutentnahme wurden die Proben gut gemischt und aufrecht für mindestens 30 min, maximal 60 min bei Raumtemperatur (RT) gelagert (circa 22-24°C), bevor in den nächsten Schritten die Trennung der korpuskulären Elemente vom Blutserum oder Blutplasma erfolgte. Nach einer ersten Zentrifugation (Heraeus Sepatech, Biofuge 28RS) bei 1917g und 4°C für 10 min wurde der Überstand aus den Monovetten entnommen und in bereitstehende 2 ml EPPENDORF® „Safe-Lock tubes“ (Order no.: 0030 120.094) aliquotiert. Um die Gewinnung von möglichst reinen Serum- und Plasmaproben zu gewährleisten, wurde das Material dann einer erneuten zehnmütigen Zentrifugation bei 4°C zugeführt (EPPENDORF® Centrifuge 5403), diesmal bei 16000g. Der dadurch gewonnene Überstand wurde in 1,5 ml BIOZYM Probenröhrchen (Art.No. 710005) pipettiert und bis zur Bestimmung bei -80°C gelagert.

Abweichungen von diesem Schema der Probengewinnung wurden beim Lagerungsversuch (S. 35) vorgenommen. Da hierbei das Verhalten der S100-Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit und -temperatur vor der ersten Zentrifugation untersucht werden sollte, erfolgte die Zentrifugation der Proben jeweils erst nach einer Lagerung von 30 min, 2 h und 4 h bei Raumtemperatur sowie von 8 h bei 4°C. Die weiteren Schritte erfolgten dann wieder nach dem beschriebenen Schema.

Die Blutentnahme bei dem Patientenkollektiv erfolgte jeweils vor Beginn der Diagnostik bzw. der individuellen Therapie. Es wurden Monovetten der Firma Sarstedt verwendet. Serum wurde in Monovetten mit gerinnungsförderndem Kunststoffgranulat und Plasma in mit Lithium-Heparin beschichteten Monovetten gewonnen. Die Zentrifugation der Blutproben erfolgte

innerhalb von 30–60 min nach Blutentnahme für 10 min mit 1917g (Heraeus Sepatech, Biofuge 28RS). Der Überstand wurde in 1.5 ml BIOZYM Probenröhrchen (Art.No. 710005) bei -80°C gelagert.

Für die Untersuchungen zum Verlauf der S100-Protein-Konzentration nach Prostatektomie (S100-Protein-Eliminationskinetik) wurde den Patienten zu 6 Zeitpunkten Blut entnommen. Die Entnahmen erfolgten vor Operationsbeginn, zum Zeitpunkt der Organentfernung und 2, 5, 24 und 72 Stunden nach der Operation. Als Entnahmesysteme dienten Serum-Monovetten mit gerinnungsförderndem Kunststoffgranulat der Firma Sarstedt. Die Proben wurden, wie oben beschrieben, zur Analytik vorbereitet.

3.3. Prinzipien der S100-Protein-Bestimmung

Da es zur Bestimmung des dimeren S100A8/A9 und seiner Monomere S100A8 und S100A9 mehrere ELISA-Testsysteme gibt und Analysen zur deren Vergleichbarkeit und zur Anwendung bei der Bestimmung der S100-Protein-Konzentration beim Prostatakarzinom fehlten, hatten wir uns entschlossen, für diese Studie fünf Tests von insgesamt vier verschiedenen Firmen zu verwenden. Drei dieser Tests sollten für die Bestimmung der dimeren, zwei für die Bestimmung der monomeren Form dienen. Die Tabelle 5 bietet eine Übersicht über die verwendeten Tests.

Tabelle 5. Verwendete ELISA-Testsysteme und Probenverdünnung (PV) für die S100-Protein-Bestimmung

Analyt	Testsystem	Firma	PV Serum	PV Plasma
S100A8/A9	hk325	HyCult biotechnology b.v.; Uden, Niederlande	1:51	1:51
S100A8/A9	Bühlmann MRP8/14	Bühlmann Laboratries AG; Schönbuch, Schweiz	1:51	1:51
S100A8/A9	PhiCal™ Test	Immundiagnostik AG; Bensheim, Deutschland	1:11	1:11
S100A8	S-1007	BMA Biomedical AG; Augst, Schweiz	1:2	1:2
S100A9	S-1008	BMA Biomedical AG; Augst, Schweiz	1:2	1:2

Alle verwendeten ELISA-Tests funktionierten nach dem Sandwich-Prinzip. Dazu wurden die Standards und Proben nach jeweiliger Verdünnung auf eine mit S100-Protein-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und methodenabhängig über unterschiedliche Zeit inkubiert. Da sich alle Tests in der Abfolge der einzelnen Testschritte unterscheiden (Inkubationszeiten, Inkubationsbedingungen, Zusammensetzung der einzelnen Reagenzien),

wird im Folgenden nur generell auf das sich in allen Tests gleichende Testprinzip eingegangen. Die Details zu den einzelnen Systemen wurden in Abbildung 1 und Tabelle 6 zusammengefasst.

Nach einer ersten Inkubationszeit erfolgte ein erster Waschschrift zur Entfernung nicht gebundener Antigene. Anschließend wurde bei den Systemen der Firmen Bühlmann Laboratories AG, Immundiagnostik AG und BMA Biomedical AG die Erfassung des Antigens durch die Zugabe eines enzymbeladenden Antikörpers (direkter Test) durchgeführt. Bei dem Test der Firma Hycult biotechnology b.v., der als indirekter Test konzipiert ist, erfolgte die Bindung des Antigens an einen spezifischen, jedoch unmarkierten Antikörper (Tracer), der nach einer Inkubation und einem Waschschrift wiederum mit einem für die Farbreaktion notwendigen Streptavidin-Peroxidase-Konjugat erfasst wurde. Nach einer erneuten Inkubation und einem Waschschrift, wodurch bei allen Tests das nicht gebundene Konjugat entfernt wurde, erfolgte die Zugabe des für die Farbreaktion notwendigen Substrats mit dem am Antikörper gebundenen Enzym. Nach Beenden der Enzymreaktion mit einer sauren Stopp-Lösung wurde der entstandene Farbkomplex mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Fotometers gemessen (HTII, Anthos, Salzburg, Österreich). Die S100-Protein-Konzentration wurde im 4-Parameter-Auswerteverfahren mit einer Standardkurve ermittelt (MikroWin 3.23, Mikrotek Laborsystem GmbH, Berlin).

Als Kontrollmaterial zur intraserialen und interserialen Präzisionskontrolle wurde ein hauseigener Li-Heparin Plasmapool (LiH Pool 300603 "DNA") verwendet.

Vor der jeweiligen Bestimmung wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Hilfe eines Vortex-Mixers (Vortex-Genie-2, Scientific Industries®) gut durchmischt. Eine Verdünnung mit den jeweils in den ELISA-Testsystemen enthaltenen Verdünnungspuffern erfolgte nach den Ergebnissen von Untersuchungen zur Linearitätscharakterisierung des jeweiligen Testsystems anhand verschiedener Verdünnungen. In Tabelle 5 sind die in der Regel eingesetzten Verdünnungsverhältnisse angegeben.

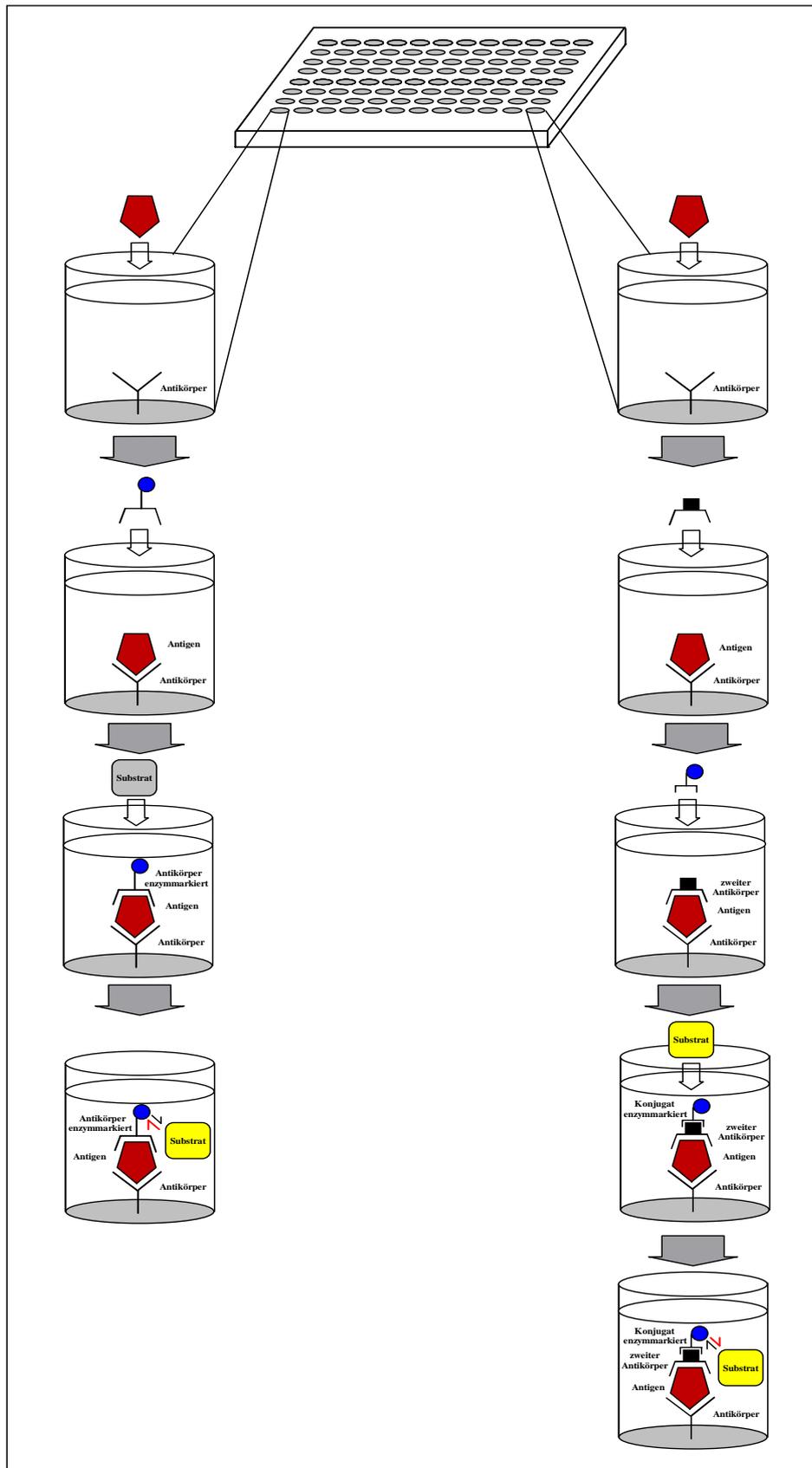


Abbildung 1. Generelle Darstellung der verwendeten ELISA-Testsysteme. Die Systeme der Firmen Immundiagnostik und BMA folgen dem linken Ablauf (direkter Test). Die rechte Abbildung stellt das Prinzip eines indirekten Tests dar, das dem Test der Firma Hycult zugrunde liegt.

Tabelle 6. Spezifische Testabfolgen

	<u>HyCult</u> <u>S100A8/A9</u>	<u>Bühlmann</u> <u>S100A8/9</u>	<u>ImmunD.</u> <u>S100A8/A9</u>	<u>BMA</u> <u>S100A8</u>	<u>BMA</u> <u>S100A9</u>
Vorwäsche	X	300 µl, 2x	250 µl, 5x	X	X
Inkubationspuffer	X	100 µl	X	100 µl blocking buffer	100 µl blocking buffer
Probenmenge	100 µl	100 µl	50 µl	100 µl	100µl
1. Inkubation	1 h, RT	30 min, RT, Schüttelfrequenz 800-1000/min	1 h, RT, Schütteln	90 min, 37°C	45 min, 37°C
Waschschritte	200 µl, 4x	300 µl, 4x	250 µl, 5x	300 µl, 4x	300µl, 4x
Waschpuffer	Firmeneigen	Firmeneigen	Firmeneigen	PBS	PBS
Enzym	Streptavidin- Peroxidase	Meerrettich- Peroxidase	alkalische Phosphatase	Streptavidin- Peroxidase	Streptavidin- Peroxidase
2. Inkubation	1 h, RT	30 min, RT, Schüttelfrequenz 800-1000/min	1 h, RT, Schütteln	45 min, 37°C	1 h, 37°C
3. Inkubation	1 h, RT	X	X	X	X
Substrat	TMB	TMB	pNPP	TMB	TMB
Reaktionszeit	20-30 min, RT	10-20 min, RT	10-20 min, RT	10 min, RT	2-3 min, RT
Stopp-Lsg.	2 mol/l Zitronensäure	0.25 mol/l Schwefelsäure	X	1 mol/l Schwefelsäure	1 mol/l Schwefelsäure
Messwellenlänge (nm)	450	450	405	450	450
Ref.wellenlänge (nm)	620	620	X	620	620

Abkürzungen: RT, Raumtemperatur; pNPP, p-Nitrophenyl-Phosphat; TMB, Tetramethylbenzidin; PBS, phosphate buffered saline

3.4. Spezifität der ELISA-Testsysteme

Die Angaben zur Testspezifität wurden den Vorschriften zur Testdurchführung der einzelnen Firmen entnommen.

Test HK325 der Firma Hycult biotechnology b.v.:

Dieser Test wurde für die quantitative Messung des humanen S100A8/A9-Heterodimers in Blut, Zellkulturmedium, Urin und Stuhl konzipiert. Die minimale Detektionsgrenze liegt bei 1,6 µg/l, die maximale bei 100 µg/l. Der Test ist nicht zur quantitativen Messung des Monomers geeignet.

Test MRP8/14 der Firma Bühlmann Laboratories AG:

Der Test wurde für die quantitative in vitro Bestimmung der S100A8/A9-Konzentration in humanem Serum, Plasma und Urin konzipiert. Die Detektionsgrenze liegt bei 3 µg/l.

Test PhiCal™ der Firma Immundiagnostik AG:

Der Test wurde zur in vitro S100A8/A9-Protein-Bestimmung aus Stuhl konzipiert. Der Detektionsbereich wurde mit 10,0 bis 30,0 µg/l angegeben.

Test S-1007 der Firma BMA Biomedical AG:

Der Test wurde für die S100A8-Bestimmung in Blutserum und Plasma, synovialer Flüssigkeit, Sputum, bronchioalveolarer Flüssigkeit und Urin konzipiert und erfasst spezifisch nur das Monomer S100A8.

Test S-1008 der Firma BMA Biomedical AG:

Der Test wurde für die S100A9-Bestimmung in Blutserum und Plasma, synovialer Flüssigkeit, Sputum, bronchioalveolarer Flüssigkeit und Urin konzipiert und erfasst spezifisch das Monomer S100A9.

3.5. Statistische Auswertung

Die Programme GraphPad Prism 4.03 für Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) und SPSS 12.0.1 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) wurden für die statistische Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte wie im Einzelnen an entsprechender Stelle erwähnt, mit parametrischen (t-Test nach Student, gepaarter t-Test, ANOVA-Verfahren mit anschließendem Dunnett-Test) sowie parameterfreien Tests (Mann-Whitney-U-Test, Wilcoxon-Test, Kruskal-Wallis-Test und Friedmann-Test mit anschließendem Post-Test). Für die Berechnungen der Receiver-Operating-Characteristics (ROC)-Analysen wurde das Programm MedCalc, Version 9.3.0.0 eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung zu präanalytischen Einflussgrößen

Da es bisher keine bzw. wenig Daten zu den hier angewandten ELISA-Testsystemen und deren Anwendung bei Erkrankungen der Prostata gab, war es unbedingt erforderlich, vor den eigentlichen Bestimmungen an Patienten Untersuchungen zu präanalytischen Faktoren der S100-Protein-Bestimmung durchzuführen. Dies bezieht sich im Wesentlichen auf die Art des verwendeten Untersuchungsmaterials. Im Folgenden wird dies in separaten Kapiteln besprochen.

4.1.2. Einfluss des Untersuchungsmaterials auf die S100-Protein-Konzentration

Um den Einfluss des zur Bestimmung eingesetzten Probenmaterials auf die gemessene Konzentration von S100A8, S100A9 und S100A8/A9 zu ermitteln, wurde Serum und Plasma von 5 weiblichen und 5 männlichen Probanden verglichen. Unter zur Hilfenahme von Entnahmesystemen der Firma Sarstedt, die auf Seite 19 detailliert beschrieben sind, wurden jedem Probanden mittels Venenpunktion jeweils zwei Serum- (mit und ohne Gerinnungsaktivator) und drei Plasmaproben (EDTA-, Heparin- und Citrat-Plasma) entnommen.

Die Messungen der zwei unterschiedlichen Serum- sowie drei Plasmaprobenarten erfolgten mit den fünf erwähnten unterschiedlichen ELISA-Testsystemen. Für die Monomere S100A8 und S100A9 standen jeweils Tests der Firma BMA zur Verfügung. Für das Heterodimer S100A8/A9 wurden die Testsysteme der Firmen Hycult, Bühlmann Laboratories und Immundiagnostik eingesetzt. Eine Übersicht über die Messwerte bieten die folgenden Tabellen 7 und 8 sowie die Abbildungen 2 und 3. Die Probenmaterialien sind in Form der Kurzbezeichnungen in der Tabelle aufgeführt.

Tabelle 7. Einfluss des Untersuchungsmaterials auf die S100A8/A9-Konzentration
Übersicht der ermittelten Messwerte von 10 Probanden

Testsystem	Probenmaterial	Median (Min; Max) (µg/l)	Mittelwert ± SD (µg/l)
Hycult S100A8/A9	S+	357 (241; 1064)	488 ± 304
	S-	402 (274; 1048)	459 ± 234
	LiH	262 (142; 648)	301 ± 147
	KEDTA	195 (97,5; 297)	192 ± 55,2
	Citrat	162 (86,3; 301)	173 ± 59,9
Bühlmann S100A8/A9	S+	2677 (1706; 4307)	2931 ± 927
	S-	2531 (1884; 4321)	2772 ± 853
	LiH	1828 (1406; 2596)	1883 ± 353
	KEDTA	1089 (545; 1600)	1094 ± 337
	Citrat	1226 (466; 1508)	1137 ± 339
Immundiagnostik S100A8/A9	S+	610 (422; 1305)	763 ± 318
	S-	650 (324; 2084)	798 ± 511
	LiH	406 (227; 744)	459 ± 183
	KEDTA	290 (123; 410)	290 ± 78,9
	Citrat	294 (88,7; 353)	260 ± 77,8

Tabelle 8: Einfluss des Untersuchungsmaterials auf die S100A8- und S100A9-Konzentration

Übersicht der ermittelten Messwerte von 10 Probanden

Testsystem	Probenmaterial	Median (Min; Max) (µg/l)	Mittelwert ± SD (µg/l)
BMA S100A8	S+	22,0 (10,1; 1023)	125 ± 316
	S-	30,0 (5,02; 1037)	129 ± 319
	LiH	24,6 (3,84; 937)	119 ± 288
	KEDTA	19,1 (7,80; 568)	75,2 ± 174
	Citrat	24,1 (0,10; 570)	76,8 ± 174
BMA S100A9	S+	2,80 (0,47; 13,7)	4,03 ± 3,78
	S-	3,27 (0,48; 11,2)	3,86 ± 3,22
	LiH	2,55 (0,50; 16,7)	4,29 ± 4,85
	KEDTA	2,94 (0,90; 22)	5,32 ± 6,13
	Citrat	3,26 (1,13; 12,9)	4,12 ± 3,73

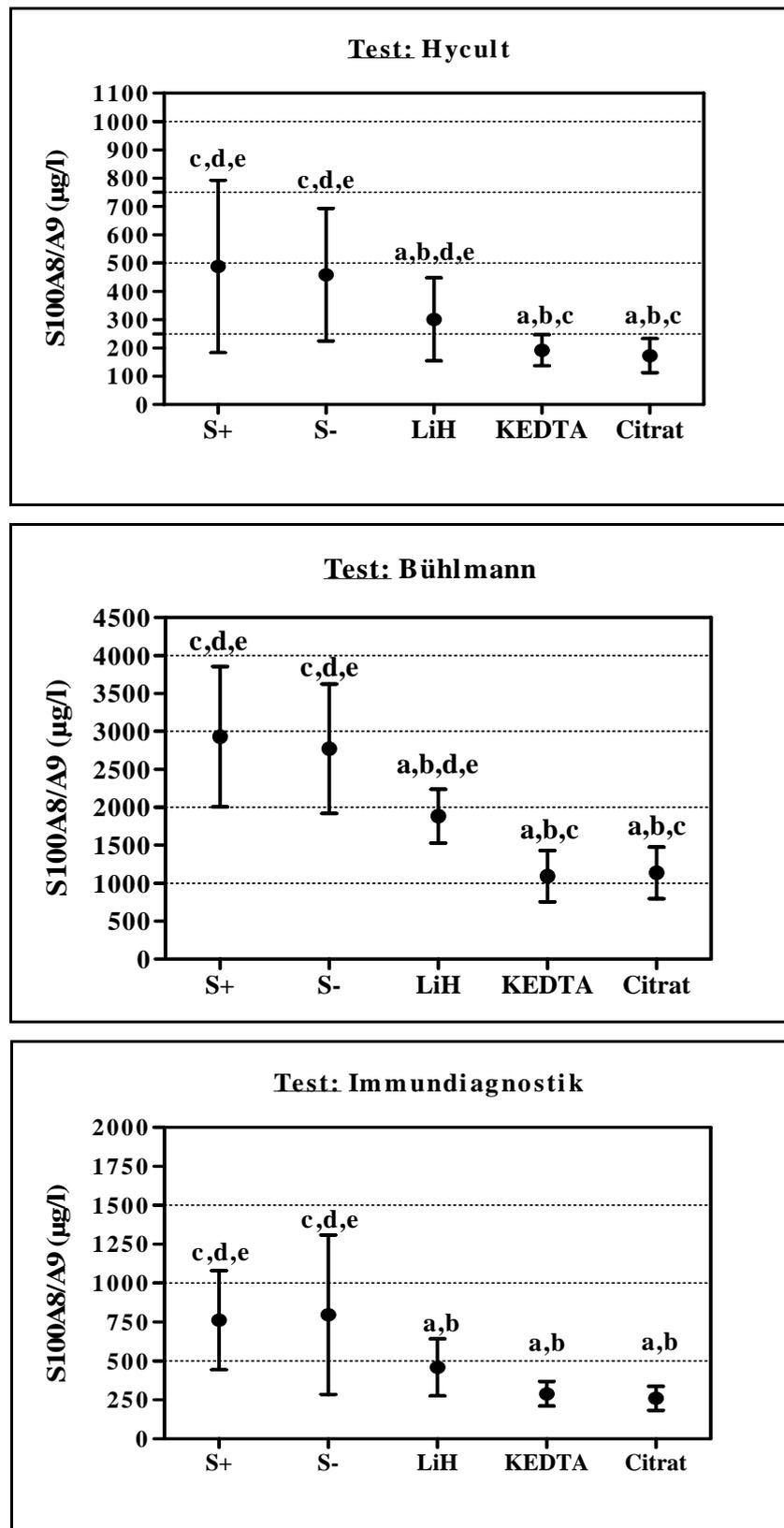


Abbildung 2.

Einfluss des Untersuchungsmaterials auf die S100A8/A9-Konzentration, gemessen mit Tests verschiedener Hersteller. Darstellung der Mittelwerte \pm SD. Signifikante Unterschiede (mindestens $P < 0,05$) ermittelt mit dem ANOVA-Test für wiederholte Messungen: a, zu Serum (S+); b, zu Serum (S-); c, zu LiH-Plasma; d, zu Kalium-EDTA-Plasma; e, zu Citrat-Plasma. Messwerte ermittelt von 10 Probanden.

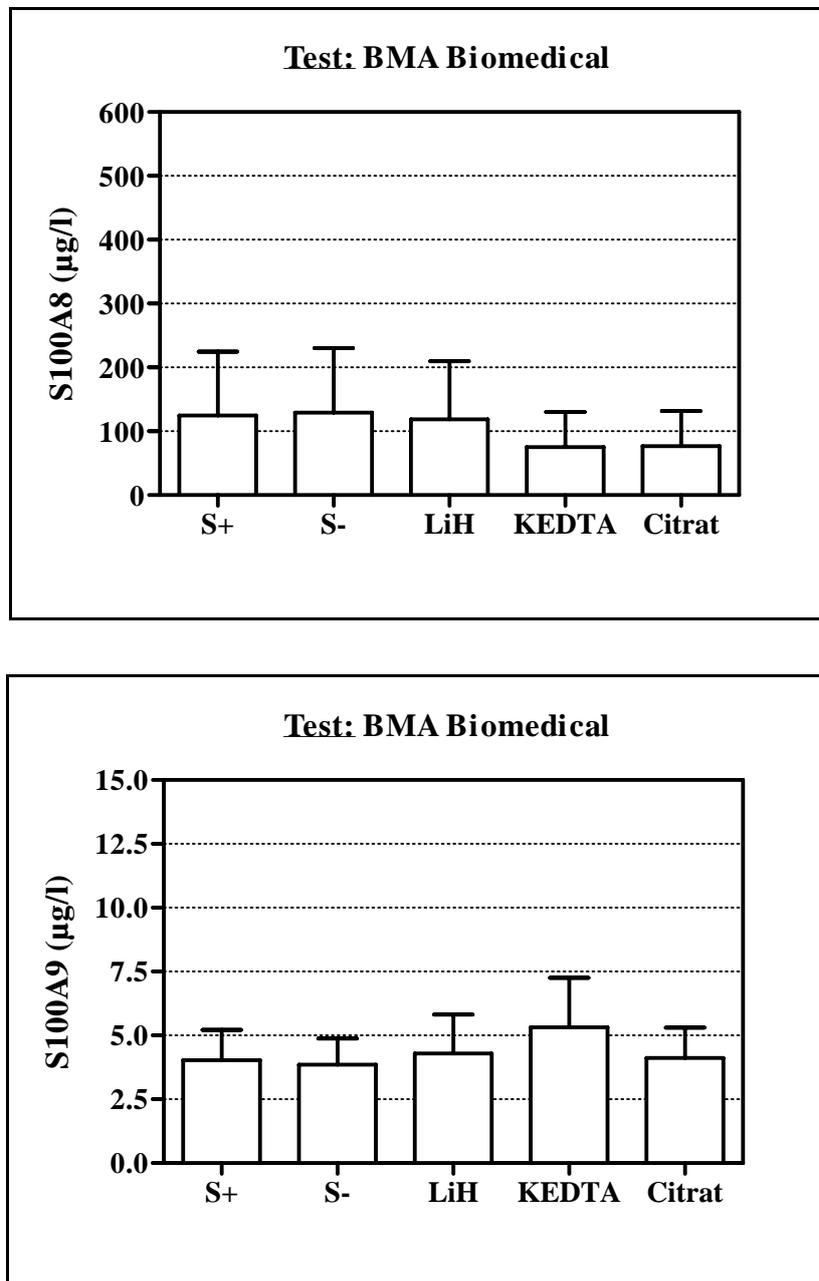


Abbildung 3.

Einfluss des Untersuchungsmaterials auf die S100A8- und S100A9-Konzentration. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Im ANOVA-Test für wiederholte Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Messwerte ermittelt von 10 Probanden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests für wiederholte Messungen. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

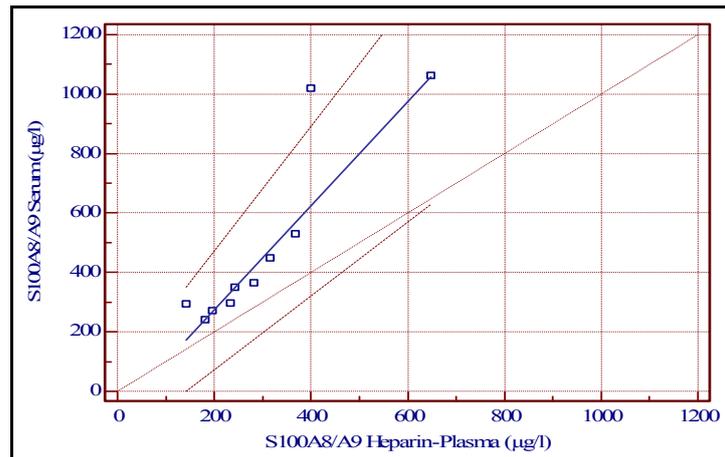
1. Die mit den drei verschiedenen Tests ermittelten Werte der S100A8/A9-Konzentration sind deutlich unterschiedlich. So betrug der mit dem Hycult-Test gemessene Mittelwert der S100A8/A9-Konzentration gegenüber dem mit dem Bühlmann-Test gemessenem nur rund 1/6. Dies ist die Folge der verschiedenen Kalibrationen der Tests, wie zusätzliche Rekalibrationsuntersuchungen ergaben.
2. Unterschiede zwischen den im nativen Serum (S-) und im Serum mit Gerinnungsverstärkung (S+) gemessenen S100A8/A9-Konzentrationen bestanden nicht.
3. Die im Serum gemessenen S100A8/A9-Konzentrationen sind jeweils höher als die im Plasma.
4. Zwischen den untersuchten Plasmaproben bestehen ebenfalls Unterschiede. Während EDTA- und Citrat-Plasma keine Unterschiede in den S100A8/A9-Konzentrationen aufwiesen, ist die mit den Tests der Firmen Hycult und Bühlmann gemessene Konzentration im Heparin-Plasma signifikant höher.
5. Für die Monomere S100A8 und S100A9 bestanden die für das Heterodimer beschriebenen Unterschiede nicht. Die Konzentrationen waren in Serum und Plasma nicht signifikant unterschiedlich.

Zur weiteren Klärung der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Konzentrationen erfolgten Korrelationsanalysen mit Errechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und Regressionsanalysen nach Passing-Bablok. Die einzelnen Regressionsgeraden sind in den Abbildungen 4 bis 6 dargestellt. Es resultieren daraus die folgenden zusammenfassenden Ergebnisse:

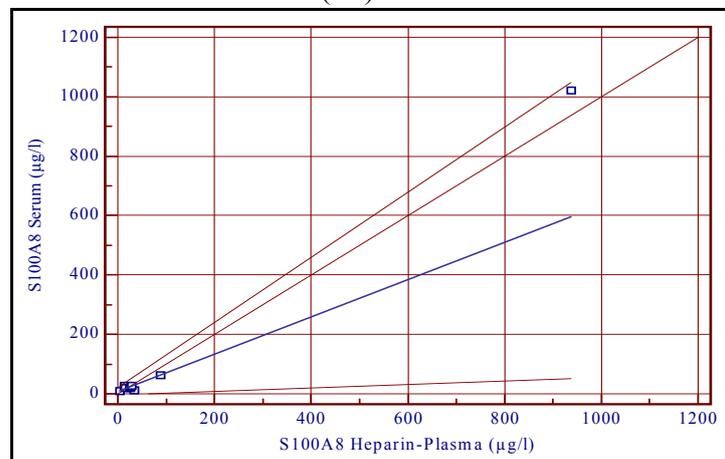
1. Für die mit dem Test der Firma Hycult ermittelten S100A8/A9-Konzentrationen im Serum und Li-Heparin-Plasma ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,964 ($P < 0,01$). Der Passing-Bablok-Test bestätigte einen linearen Zusammenhang mit der Regressionsgleichung $y = -76,3 + 1,75 x$.

-
2. Für die Monomere S100A8 und S100A9 konnten ebenfalls lineare Zusammenhänge im Passing-Bablok-Test nachgewiesen werden (S100A8 $y=8,65+0,63 x$; S100A9 $y=-0,42+0,85 x$).

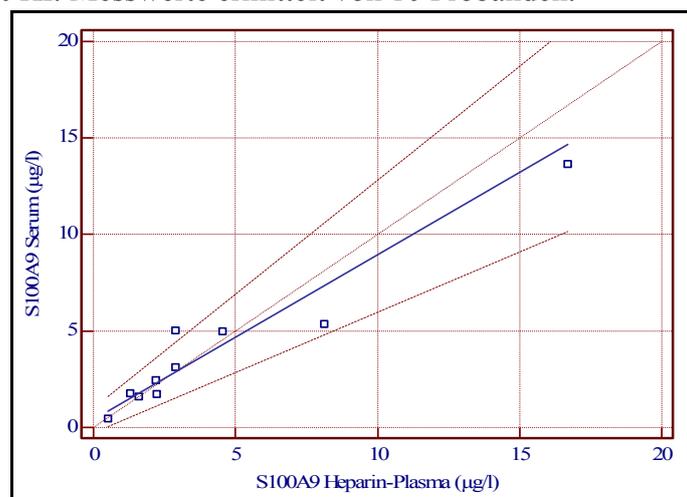
Für die eben angesprochene Analyse stand leider nur das recht kleine Untersuchungskollektiv der präanalytischen Untersuchungen zur Verfügung, jedoch konnten die gefundenen Zusammenhänge im folgenden Patientenvergleich bestätigt werden.

**Abbildung 4.**

S100A8/A9-Konzentration im Serum im Vergleich zu Heparin-Plasma. Die Passing-Bablok-Regression ist: $y = -76,3(-178 \text{ bis } 51,5) + 1,75(1,25 \text{ bis } 2,10) x$. Die Angaben in Klammern entsprechen den 95 % Konfidenzintervallen (KI). Messwerte ermittelt von 10 Probanden.

**Abbildung 5.**

Vergleich der S100A8-Konzentration im Serum und Heparin-Plasma. Die Passing-Bablok-Regression ist: $y = 8,65(-3,69 \text{ bis } 20,9) + 0,63(0,06 \text{ bis } 1,10) x$. Die Angaben in Klammern entsprechen den 95 % KI. Messwerte ermittelt von 10 Probanden.

**Abbildung 6.**

Vergleich der S100A9-Konzentration im Serum und Heparin-Plasma. Die Passing-Bablok-Regression ist: $y = -0,42(-0,25 \text{ bis } 1,04) + 0,85(0,62 \text{ bis } 1,18) x$. Die Angaben in Klammern entsprechen den 95 % KI. Messwerte ermittelt von 10 Probanden.

4.1.3. Einfluss von Frier-Tau-Zyklen auf die S100-Protein-Konzentration

Um den Einfluss von mehrmaligem Frieren und Tauen auf die S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen zu ermitteln, wurden bei fünf gesunden Probanden mittels Venenpunktion jeweils Serum (Serummonovetten mit Gerinnungsaktivatoren) und Plasma (Plasmamonovette mit Li-Heparin) entnommen.

Die Untersuchung der Seren und Plasmen zielte darauf ab, mögliche Konzentrationsänderungen nach jeweils einmaligem, dreimaligem und fünfmaligem Auftauen und Einfrieren zu prüfen. Hierfür wurden die jeweiligen Proben 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut, mit Hilfe des Vortexmixers durchmischt und vor dem erneuten Einfrieren bei -80°C weitere 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dieser Rhythmus wurde für die mehrfach aufzutauenden Proben nach 24 Stunden wiederholt.

Die Messung der unterschiedlichen Proben erfolgte nach Abschluss des letzten Frier-Tauzyklus mit dem ELISA-Test der Firma Hycult für den Komplex S100A8/A9 und für die Einzelproteine mit den entsprechenden Tests der Firma BMA. Eine Übersicht über die Ausgangsmesswerte bietet die Tabelle 9. Diese Werte wurden 100 % gesetzt und die weiteren Proben (1 x Tauen, 3 x Tauen, 5 x Tauen) zu diesen in Bezug gebracht.

Tabelle 9. Einfluss wiederholter Frier-Tau-Zyklen auf die S100-Protein-Konzentrationen
Übersicht der ermittelten Messwerte von 5 Probanden

Testsystem	Probenmaterial	Median (Min; Max) ($\mu\text{g/l}$)	Mittelwert \pm SD ($\mu\text{g/l}$)
Hycult S100A8/A9	S+	387 (280; 455)	$365 \pm 71,9$
	LiH	284 (133; 362)	$261 \pm 93,3$
BMA S100A8	S+	8.25 (1,94; 18,7)	$9,28 \pm 7,78$
	LiH	7.74 (4,13; 11,5)	$7,78 \pm 3,55$
BMA S100A9	S+	3.28 (1,90; 12,5)	$4,83 \pm 4,40$
	LiH	9.1 (1,81; 11,2)	$8,08 \pm 3,62$

Die dazu erstellte Abbildung 7 verdeutlicht den Einfluss des Tauen/Frierens auf die S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen.

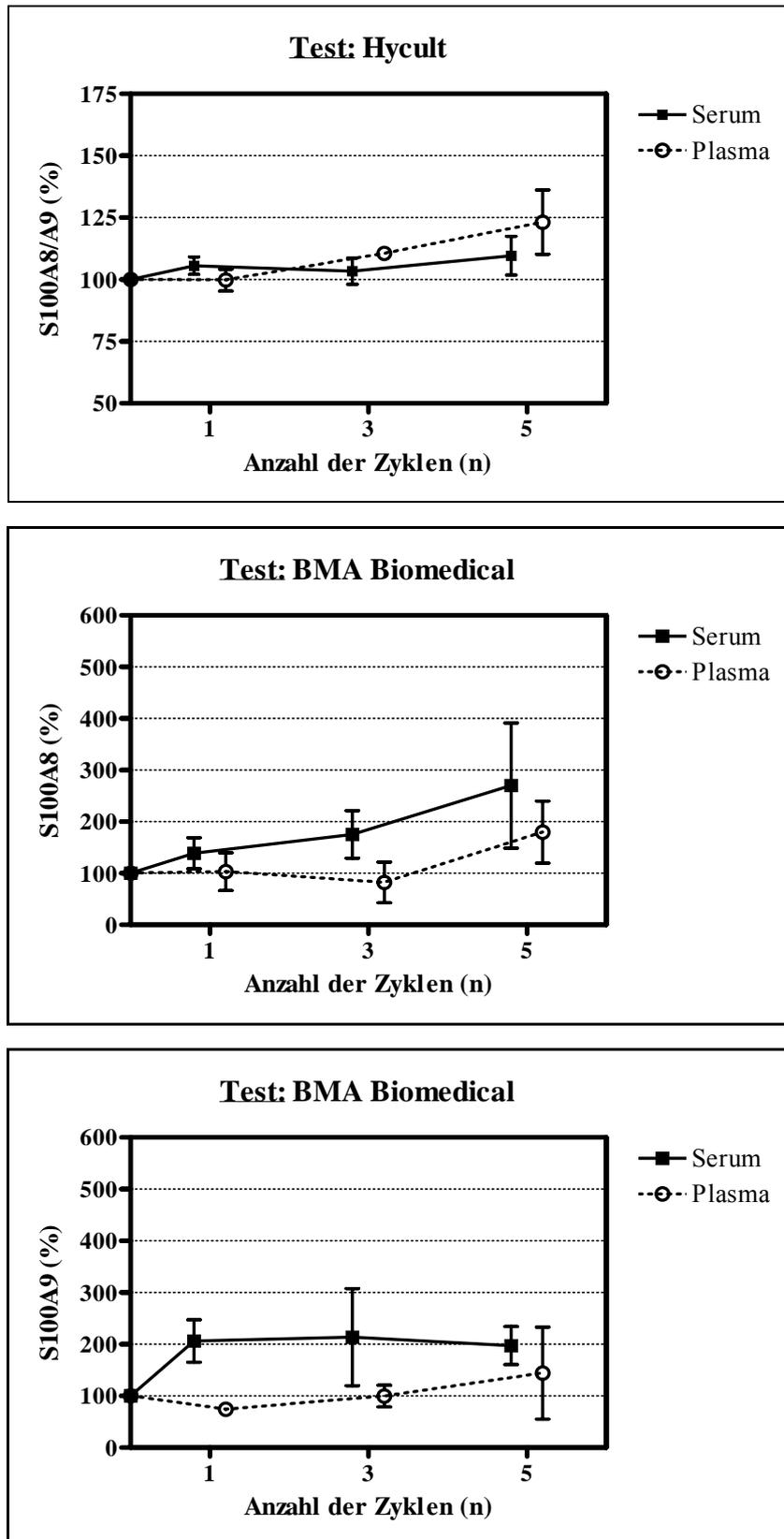


Abbildung 7.

Einfluss wiederholter Frier-Tau-Zyklen auf die S100-Protein-Konzentrationen. Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Im Dunnett-Test (ANOVA, verbundene Stichproben) konnten keine signifikanten Unterschiede zur Ausgangskonzentration festgestellt werden. Weitere Einzelheiten und Berechnungen siehe Text.

Für die S100A8/A9-Konzentration konnten mit Hilfe des ANOVA-Tests für die Messungen nach den verschiedenen Einfrier-Auftau-Zyklen keine signifikanten Unterschiede in den Serum- und Plasmaproben gegenüber dem Ausgangswert nachgewiesen werden (Dunnnett-Post-Test; $P > 0,05$). Der Post-Test für lineare Trends zeigte jedoch für Heparinplasma über die Zeit einen signifikanten Anstieg ($P = 0,0198$). Dies bestätigte die lineare Regressionsanalyse mit einem gegenüber dem Ausgangswert signifikanten Anstieg (Anstieg: 4,88; 95 % KI von 1,26 bis 8,50). Ein Vergleich aller Heparin-Proben zeigte mit dem gepaarten t-Test signifikante Unterschiede zwischen den Ausgangswerten und den Proben nach Frieren und Tauen ($P = 0,0416$). Dies verdeutlicht, dass die S100A8/A9-Konzentration im Heparin-Plasma bei wiederholtem Frieren und Tauen der Probe ansteigt. Beim Serum wurden diese Unterschiede auch nach diesen detaillierten Analysen nicht beobachtet.

Für die Monomere S100A8 und S100A9 ergibt sich ein Trend zu höheren Werten bei den Messungen im Serum. Werden alle Werte der Serumproben nach Frieren und Tauen mit den Ausgangswerten verglichen, so zeigt sich im gepaarten t-Test ein signifikanter Unterschied oder zumindest ein Trend dahin (S100A8, $P = 0,0518$; S100A9, $P = 0,0072$). Dies zeigt, dass auch die S100A8- und die S100A9-Konzentrationen bei wiederholtem Frieren und Tauen im Serum tendenziell ansteigen. In den Plasmaproben konnte ein Einfluss der verschiedenen Einfrier-Auftau-Zyklen nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich damit schlussfolgern, dass wiederholtes Tauen und Frieren sowohl bei Serum- als auch Plasmaproben zu veränderten S100-Protein-Konzentrationen führen kann. Für die S100-Bestimmungen sollten somit möglichst nur Proben verwendet werden, die zur Analytik erstmals aufgetaut werden.

4.1.4. Einfluss unterschiedlicher Lagerungszeiten der Blutproben bei unterschiedlichen Temperaturen auf die S100-Protein-Konzentration

Nachdem bereits Betrachtungen zum verwendbaren Untersuchungsmaterial und dem Einfluss von Frier-Tau-Zyklen durchgeführt wurden, sollte in diesem Schritt untersucht werden, welchen Einfluss Lagerungszeiten (30 min, 2, 4, 8 h) und Lagerungstemperaturen (Raumtemperatur, 4°C) vor der ersten Zentrifugation auf die Konzentration der S100-Proteine im Serum haben. Dazu wurde sechs gesunden Probanden jeweils 6-mal per Venenpunktion mit Hilfe des Serum-Monovettensystems der Firma Sarstedt Blut entnommen und dieses, wie auf Seite 18 dargestellt, aufgearbeitet. Die erste Probe eines jeden Probanden galt für den Rest der Untersuchung als Bezugswert für die anderen Lagerungszeiten.

Die Messung der unterschiedlichen Proben erfolgte nach abgeschlossener Bearbeitung aller Proben, jeweils mit drei unterschiedlichen ELISA-Testsystemen. Eine Übersicht über die Ausgangsmesswerte bietet die Tabelle 10.

Tabelle 10. Einfluss der Lagerungszeit der Blutproben bei Raumtemperatur und 4 °C vor der Zentrifugation auf die S100-Protein-Konzentrationen im Serum.

Übersicht der ermittelten Messwerte (n=6). Die Angaben unter der Rubrik „Zeit“ beziehen sich auf die Intervalle zwischen Venenpunktion und Zentrifugation der Probe. Die Lagerung der Probe erfolgte bei Raumtemperatur (RT) bzw. 4°C.

Testsystem	Zeit	Temperatur	Median (Min, Max) (µg/l)	Mittelwert ± SD (µg/l)
Hycult S100A8/A9	30 min	RT	237 (171; 298)	232 ± 53
	2 h		238 (173; 367)	248 ± 73
	4 h		275 (170; 389)	275 ± 80
	8 h	4°C	179 (108; 418)	208 ± 108
BMA S100A8	30 min	RT	11,6 (3,41; 29,1)	14,6 ± 9,73
	2 h		12,8 (6,12; 26,1)	13,9 ± 7,38
	4 h		12 (9,79; 18,8)	13,6 ± 4,18
	8 h	4°C	14,8 (8,91; 18,7)	14,4 ± 3,89
BMA S100A9	30 min	RT	9,63 (7,80; 15,7)	10,4 ± 2,92
	2 h		8,96 (6,55; 12,2)	9,22 ± 2,05
	4 h		9,64 (7,40; 10,9)	9,22 ± 1,49
	8 h	4°C	8,88 (7,54; 10,5)	8,93 ± 1,22

Die graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen (Abbildung 8) zeigt, wie sich diese in Abhängigkeit von der Zeitdauer zwischen Blutentnahme und Zentrifugation sowie von der Temperatur, bei der die Blutproben bis zur Zentrifugation gelagert wurden, ändern. Ähnlich wie im Versuch zu den unterschiedlichen Frier-Tau-Zyklen wurde auch hier der erste Wert jedes Probanden, d.h. der Wert der bereits nach 30 min zentrifugierten Probe, 100 % gesetzt und alle weiteren Werte darauf bezogen.

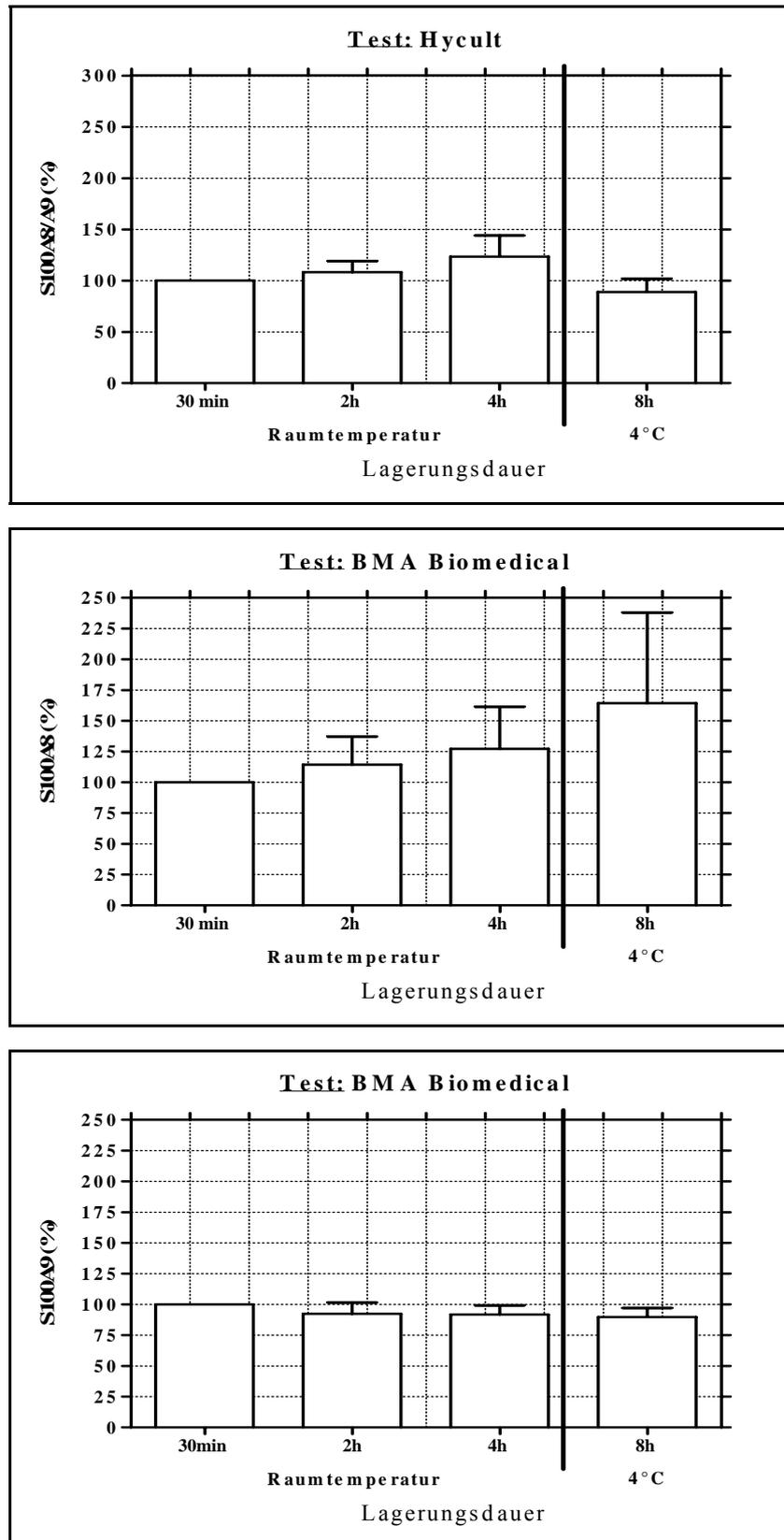


Abbildung 8

Einfluss verschiedener Lagerungszeiten und -temperaturen der Blutproben vor der Zentrifugation auf die S100-Protein-Konzentrationen. Der „30 min, RT“ Wert wurde 100 % gesetzt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests für wiederholte Messungen und dem Post-Test nach Dunnett sowie mit dem gepaarten t-Test. Signifikante Veränderungen ließen sich nicht nachweisen.

Abbildung 8 zeigt, dass die S100-Protein-Konzentrationen innerhalb von 4 h nach Blutentnahme und Aufbewahrung des Bluts bei Raumtemperatur keiner signifikanten Veränderung unterliegt. Dies zeigt sich auch bei Lagerung der Blutproben bei 4°C für 8 h.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass eine Lagerung der zu untersuchenden Blutprobe für 2 bis 4 h Stunden vor der Trennung der korpuskulären Elemente vom Blutserum oder -plasma, also zu Bedingungen, wie sie dem klinischen Alltag entsprechen, zu keiner Änderung in der gemessenen S100-Protein-Konzentrationen führt.

4.1.5. Analytische Zuverlässigkeit der Bestimmung mit verschiedenen Tests

Für die Bestimmung der S100-Protein-Konzentration standen die genannten fünf ELISA-Testsysteme der vier verschiedenen Anbieter zur Verfügung. Um die analytische Zuverlässigkeit der einzelnen Testsysteme beurteilen zu können, wurde die Präzision aus den Doppelbestimmungen der oben aufgeführten Versuche zur Präanalytik ermittelt. Hierzu wird die Standardabweichung s aus den Zweifachbestimmungen über die Formel $s = \sqrt{\sum Ri^2 / 2m}$ abgeschätzt, wobei R die Spannweite der jeweiligen Doppelbestimmung und m die Anzahl der Zweifachbestimmungen ist. Für Berechnungen standen zwischen 103 bis 106 Doppelbestimmungen der verwendeten Testsysteme zur Verfügung.

Diese Präzisionsangaben sind wichtige Kriterien, die u.a. zur Entscheidung herangezogen wurden, welcher Test für die S100-Bestimmung im Patientenkollektiv eingesetzt werden sollte. Die präanalytischen Messungen des Dimers S100A8/A9, die mit den Tests der Firmen Hycult, Bühlmann und Immundiagnostik durchgeführt wurden, wiesen einen prozentualen Variationskoeffizienten (S%) von 2,98, 13,9 bzw. 1,54 auf. Da der Test der Firma Immundiagnostik primär für die Calprotectin-Bestimmung im Stuhl konzipiert ist, wurde er für die Bestimmung im Patientenkollektiv nicht weiter berücksichtigt. Aus analytischer Sicht wurde deshalb entschieden, den Test der Firma Hycult als den Test mit dem geringsten S% für die S100A8/A9-Bestimmungen im Patientenkollektiv anzuwenden. Da für die Bestimmung der Monomere S100A8 und S100A9 jeweils nur ein Test zur Verfügung stand, musste auf die Tests der Firma BMA zurückgegriffen werden.

Die analytische Zuverlässigkeit der Bestimmungen der Patientenproben wurde mit Hilfe eines selbst zusammengestellten Serumpools ermittelt. Anhand von einer einmalig durchgeführten Zehnfachbestimmung wurde die intraserielle Präzision ermittelt und zur Ermittlung der interseriellen Präzision wurde der Serumpool auf jeder ELISA-Platte mitgeführt. Aus den sich ergebenden Mittelwerten und Standardabweichungen wurden die jeweiligen Variationskoeffizienten (S%) ermittelt. Tabelle 11 bietet einen Überblick über die sich ergebenden S%.

Tabelle 11. Intra- und interserielle Präzision der S100-Protein-Bestimmungen

Die intraserielle Präzision ergibt sich aus Zehnfachbestimmungen, der interseriellen Präzision liegen Werte von 4 Messungen zugrunde.

Test	intraserielle Präzision (S%)	interserielle Präzision (S%)
Hycult S100A8/A9	12,8	12,8
BMA S100A8	13,7	13,2
BMA S100A9	9,12	17,8

4.2. S100-Protein-Konzentrationen in den untersuchten Patientengruppen

4.2.1. Patientenselektion: Vermeidung eines sog. Verifikationsfehlers

Die klinischen Daten zu den vier untersuchten Patientengruppen, den Patienten mit BPH, mit lokalisierten PCa sowie mit Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen wurden bereits ausführlich im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Hier möchte ich nun auf ein spezielles Problem der Patientenselektion für meine Untersuchung eingehen.

Für eine korrekte Bewertung der späteren diagnostischen Aussagekraft von S100A8, S100A9 und S100A8/A9 im Vergleich zum Standardparameter PSA war besonders wichtig, dass zwischen den tPSA-Werten der BPH-Patienten und der PCa-Patienten (ohne Metastasen) keine Unterschiede bestehen. Wird dies nicht berücksichtigt, sind Fehlinterpretationen beim Vergleich eines neuen Markers mit der Standardkenngröße PSA nicht auszuschließen. Dies wurde in vorhergehenden Untersuchungen zum freien PSA (fPSA) an der Klinik eindeutig nachgewiesen [111] und von anderen Autoren auch bestätigt [112]. Um einen solchen Fehler zu vermeiden, wurden jeweils im tPSA-Bereich bis 20 µg/l BPH- und PCa-Patienten mit ähnlichen PSA-Werten gepaart. Als Ausschlusskriterium galt ein Unterschied $>0,48$ µg/l. Bei den Patienten ergab sich folgende Verteilung der PSA-Werte: 13 BPH- bzw. 11 PCa-Patienten mit tPSA-Werten <4 µg/l, 30 bzw. 32 Patienten im Bereich 4-10 µg/l und jeweils 7 Patienten im Bereich 10-20 µg/l.

Tabelle 12 zeigt die Messwerte der PSA-, fPSA- und %fPSA-Werte in den einzelnen Gruppen. Die Abbildung 9 gibt die Verteilung der tPSA- und %fPSA-Werte in den zwei Gruppen als Streudiagramme wieder. Es zeigte sich das typische Bild der geringeren %fPSA-Werte bei den PCa-Patienten im Vergleich zu den BPH-Patienten.

Tabelle 12. PSA-, fPSA- und %fPSA-Werte im Patientenkollektiv

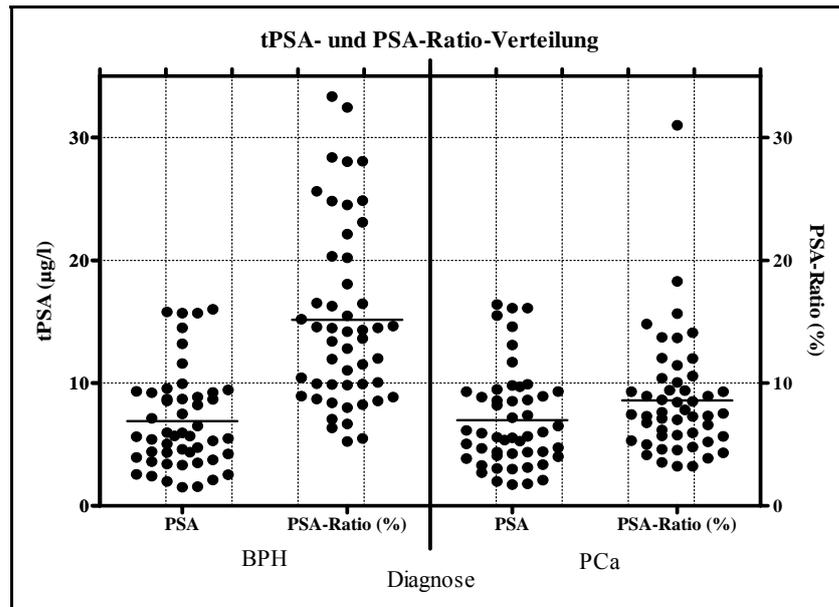
Übersicht der ermittelten Messwerte des Patientenkollektives (n=140). Abkürzungen: PCa = Patienten mit lokal begrenztem Tumor; PCaN = Patienten mit Lymphknotenmetastasen; PCaM = Patienten mit Fernmetastasen.

<u>BPH</u>	Anzahl	Median (Min; Max) (µg/l)	Mittelwert ± SD (µg/l)
PSA	50	5,70 (1,51; 16)	6,90 ± 3,98
fPSA	50	0,77 (0,21; 2,33)	0,98 ± 0,63
%fPSA	50	13,9 (5,24; 33,3)	15,2 ± 7,34

<u>PCa</u>	Anzahl	Median (Min; Max) (µg/l)	Mittelwert ± SD (µg/l)
PSA	50	5,79 (1,73; 16,4)	6,98 ± 3,99
fPSA	50	0,48 (0,15; 1,44)	0,53 ± 0,30
%fPSA	50	7,48 (3,22; 31)	8,59 ± 4,73

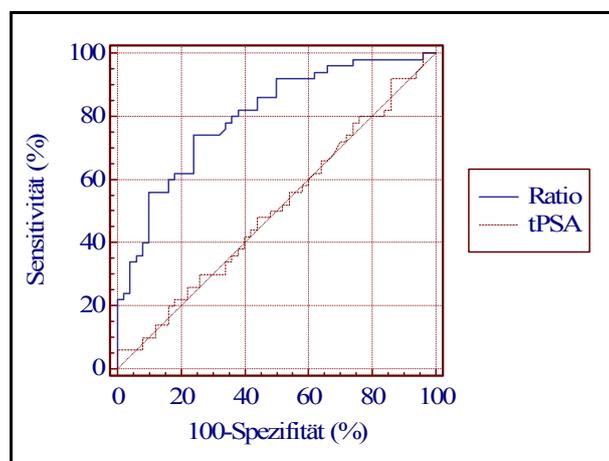
<u>PCaN</u>	Anzahl	Median (Min; Max) (µg/l)	Mittelwert ± SD (µg/l)
PSA	27	16,2 (5,40; 111)	23,9 ± 24,8
fPSA	26	1,27 (0,35; 15,1)	2,40 ± 3,50
%fPSA	26	8,03 (4,70; 22,2)	8,66 ± 3,63

<u>PCaM</u>	Anzahl	Median (Min; Max) (µg/l)	Mittelwert ± SD (µg/l)
PSA	13	149 (38,4; 3256)	551 ± 881
fPSA	3	117 (7,80; 119)	81,3 ± 63,6
%fPSA	3	20,3 (12,6; 86)	39,6 ± 40,3

**Abbildung 9**

Verteilung der tPSA- und PSA-Ratio-Werte im Patientenkollektiv. Darstellung im Streudiagramm.

Werden die beiden Kenngrößen tPSA und %fPSA zur Differenzierung zwischen beiden Gruppen herangezogen, ergibt sich in der ROC-Analyse, dass tPSA (AUC, Fläche unter der Kurve: $0,51 \pm 0,06$) keine Unterscheidung zwischen beiden Gruppen erlaubt, während dies sehr wohl an Hand der fPSA%-Konzentration (AUC: $0,80 \pm 0,04$) möglich ist. Der Unterschied zwischen den beiden Flächen ist signifikant ($P < 0,001$). Dies ist ein eindeutiger Beleg dafür, dass die untersuchten Patientengruppen geeignete Kohorten darstellen, an denen die klinische Validität eines neuen Markers im Vergleich zum tPSA bzw. %fPSA-Wert ermittelt werden kann.

**Abbildung 10**

ROC-Kurve für die tPSA und PSA-Ratio-Werte der BPH- und PCa-Patienten. Ratio AUC = $0,801$, t-PSA AUC = $0,507$.

4.2.2. S100-Protein-Konzentrationen im Patientenkollektiv

Die S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen wurden bei den Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH), nicht-metastasiertem Prostatakarzinom (PCa), Prostatakarzinom mit Lymphknotenmetastasen (PCaN) und mit Fernmetastasen (PCaM) bestimmt. Es wurden die ELISA-Testsysteme der Firma Hycult für die S100A8/A9-Bestimmung und die der Firma BMA Biomedical für die S100A8- und S100A9-Bestimmung verwendet. Da für S100A8/A9 unterschiedliche Konzentrationen in Serum und Plasma ermittelt wurden, erfolgte die Bestimmung für beide Probenarten. Bei Plasma wurde aus organisatorischen Gründen auf Heparinplasma zurückgegriffen, bei den Serumproben stand nicht von allen Patienten Material zur Verfügung (siehe Tabelle 13). Für S100A8 sowie S100A9 wurden andererseits nur Bestimmungen im Heparinplasma durchgeführt, da in den Voruntersuchungen (siehe S. 26) keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Serum- und Plasmaprobenarten beobachtet wurden. Einen Überblick über die Messwerte bieten die Tabellen 13 bis 15.

Tabelle 13. Deskriptive Statistik zu den S100A8/A9-Bestimmungen in den Patientengruppen

Test-system	Material	Diagnose	Anzahl	Minimum (µg/l)	Median (µg/l)	Maximum (µg/l)	Mittelwert (µg/l)	Stand.abw. (µg/l)
<u>Hycult S100A8/A9</u>	LiH	BPH	50	14,3	313	1297	391	303
		PCa	50	0,79	240	1225	307	241
		PCaM	13	126	358	646	368	191
		PCaN	27	29,5	211	660	233	138
<u>Hycult S100A8/A9</u>	Serum	BPH	28	118	470	1743	621	452
		PCa	24	226	564	1422	648	317
		PCaM	8	208	391	820	471	234
		PCaN	25	155	415	870	419	174

Tabelle 14. Deskriptive Statistik zu den S100A8-Bestimmungen in den Patientengruppen

Test-system	Material	Diagnose	Anzahl	Minimum (ng/ml)	Median (ng/ml)	Maximum (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	Stand.abw. (ng/ml)
<u>BMA S100A8</u>	LiH	BPH	49	2,34	9,85	221	19,8	34,9
		PCa	50	1,15	6,26	125	10,6	18,1
		PCaM	13	2,50	8,14	251	32,6	67,0
		PCaN	27	2,34	7,81	270	29,4	62,7

Tabelle 15. Deskriptive Statistik zu den S100A9-Bestimmungen in den Patientengruppen

Test-system	Material	Diagnose	Anzahl	Minimum (ng/ml)	Median (ng/ml)	Maximum (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	Stand.abw. (ng/ml)
<u>BMA</u> <u>S100A9</u>	LiH	BPH	50	0,42	3,49	9,40	3,35	1,49
		PCa	50	0,48	2,69	9,05	3,03	1,79
		PCaM	13	0,84	2,48	8,54	3,38	2,04
		PCaN	27	0,60	3,15	17,3	3,95	3,87

Vor Beginn der statistischen Auswertung wurden Verteilungsprüfungen der S100-Protein-Werte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test in den einzelnen Patientenkollektiven vorgenommen. Da die Werte nicht in allen Gruppen einer Gaußschen Verteilung unterlagen, wurden alle Berechnungen mit parameterfreien Tests durchgeführt. Somit erfolgte die statistische Auswertung beim Vergleich von zwei ausgewählten Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test und für die vier untersuchten Patientengruppen mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests.

Die gemessenen S100A8/A9-Konzentrationen im Heparin-Plasma waren am höchsten bei den BPH-Patienten (Abb. 11). Die Werte waren signifikant höher ($P < 0,05$) als die Konzentrationen, die bei Prostatakarzinom-Patienten mit Lymphknotenmetastasen gemessen wurden (U-Test, $P=0,0186$). Es zeigte sich zudem eine signifikant höhere S100A8/A9-Konzentration bei Patienten mit Fernmetastasen im Vergleich zu den Patienten mit Lymphknotenmetastasen (U-Test, $P=0,0404$).

Im Serum gab es keinen nachweisbaren Unterschied zwischen den S100A8/A9-Konzentrationen der PCa- und BPH-Patienten. Eine signifikant höhere Konzentration konnte für die nicht-metastasierten PCa-Patienten im Vergleich zu den Patienten mit Lymphknotenmetastasen (PCaN-Patienten) mit Hilfe des U-Tests ermittelt werden ($P=0,0076$). Bei den Vergleichen der anderen Patientenkollektive untereinander ergab sich jedoch kein weiterer signifikanter Unterschied.

Bei der Auswertung der S100A8-Konzentrationen ergab sich im Mann-Whitney-U-Test ein signifikant höherer Wert ($P=0,0206$) für die BPH-Patienten im Vergleich zum Prostatakarzinom-Kollektiv (Abb. 12). Alle anderen Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich ihrer S100A8-Konzentrationen.

Die S100A9-Konzentrationen zeigten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen.

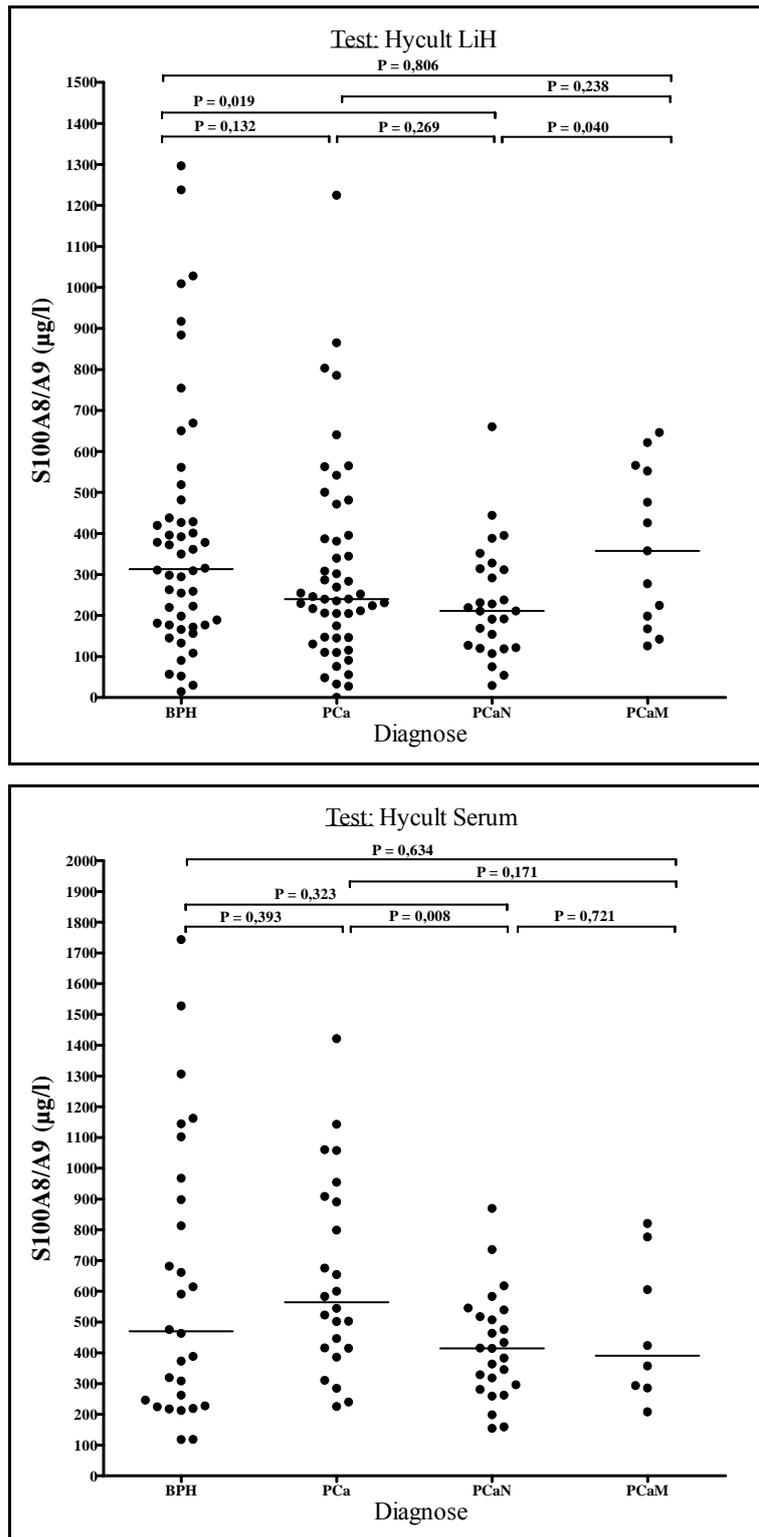


Abbildung 11

S100A8/A9-Konzentrationen im Serum und Plasma von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH), nicht-metastasiertem Prostatakarzinom (PCa), Prostatakarzinom mit Lymphknoten- (PCaN) und Fernmetastasen (PCaM). Darstellung der Einzelwerte und des Medians. Signifikante Unterschiede ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test.

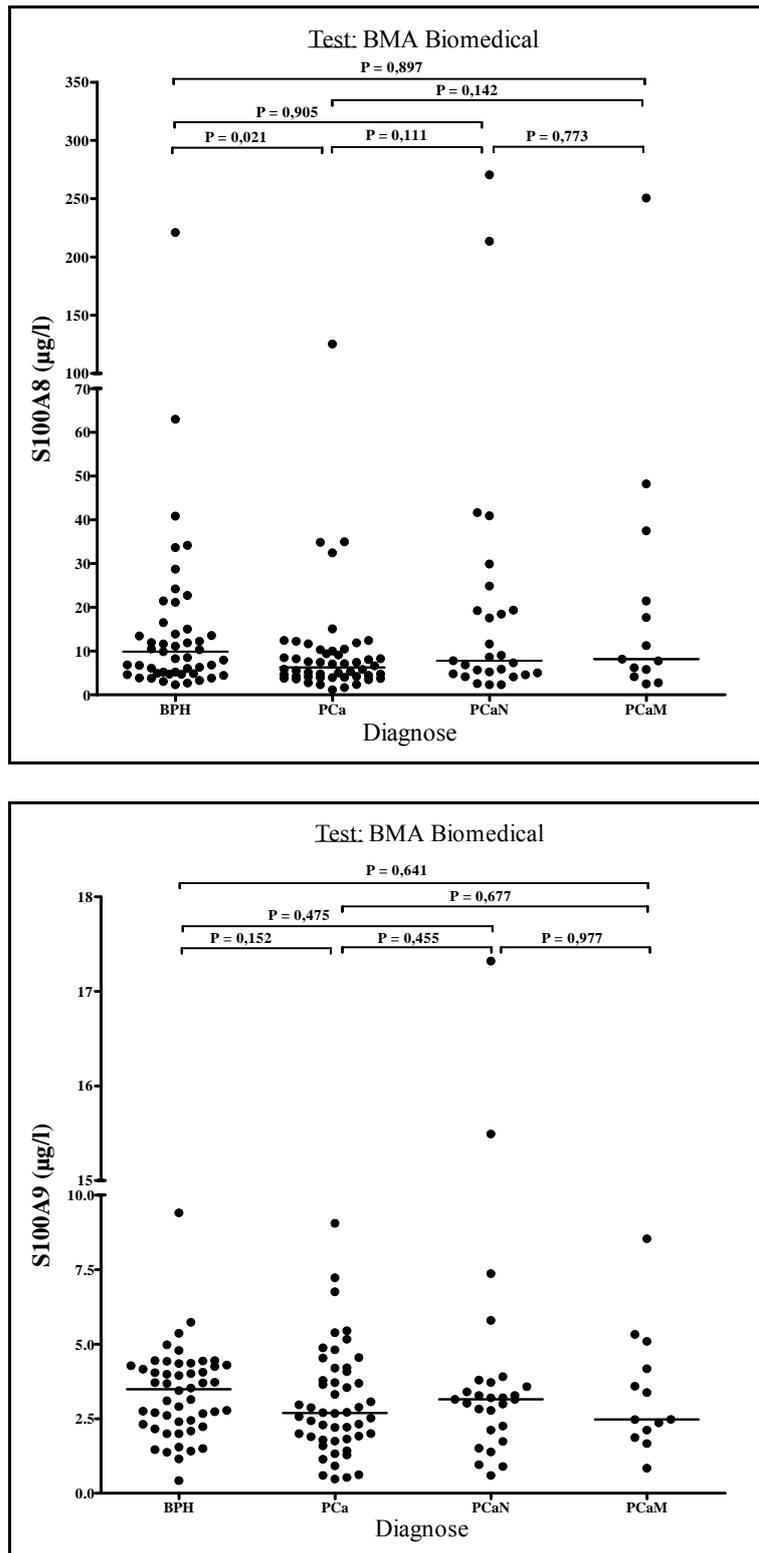


Abbildung 12

S100A8- und S100A9-Konzentrationen im Plasma von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH), nicht-metastasiertem Prostatakarzinom (PCa), Prostatakarzinom mit Lymphknotenmetastasen (PCaN) und Fernmetastasen (PCaM). Darstellung der Einzelwerte und des Medians. Signifikante Unterschiede ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test.

4.2.3. Korrelation der S100-Protein-Konzentrationen zu klinischen Parametern

Nach der Auswertung anhand der deskriptiven Statistik erfolgte die weitere Analyse mit Hilfe der Erstellung von Korrelationsmatrices. Hierbei wurden die S100-Protein-Konzentrationen mit spezifischen klinischen Parametern verglichen. Dazu erfolgte in einem ersten Schritt die Gruppierung der Patienten nach verschiedenen Diagnoseschemata und die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten r_s als Assoziationsmaß zwischen den S100-Protein-Konzentrationen und diversen klinischen Kenngrößen. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde der Koeffizient nach Spearman ermittelt.

Als klinische Einflussgrößen wurden das Alter der Patienten, das Tumorstadium und der Tumorgrad, das durch TRUS ermittelte Prostatavolumen sowie verschiedene laborchemische Daten wie die tPSA- und fPSA-Konzentrationen sowie der %fPSA-Wert aus den jeweiligen Patientenunterlagen ermittelt. Die Gruppierung der Patienten erfolgte nach der Diagnose in Karzinom und Nicht-Karzinom. Zielstellung war es, anhand von Korrelationsberechnungen die S100-Protein-Konzentrationen als Parameter zu identifizieren, die, sollten sie sich nicht als direktes Diskriminierungsmerkmal zwischen den einzelnen Diagnosen eignen, zumindest Tendenzen aufzeigen, welche im Rahmen von artifiziellen neuronalen Netzwerken (ANN) zur Diagnosefindung hilfreich sein könnten.

Trotz der in der Präanalytik gezeigten signifikanten Unterschiede zwischen den S100A8/A9-Konzentrationen im Serum und im Plasma, zeigten sich bei allen Patienten die größten signifikanten Korrelationen zwischen eben diesen beiden Werten ($r=0,78$; $P < 0,01$). Der Passing-Bablok-Test (Abb. 13) bestätigte einen linearen Zusammenhang mit der Regressionsgleichung $y=65,5 + 1,38 x$. Somit kann davon ausgegangen werden, dass trotz der starken Unterschiede die S100A8/A9-Konzentrationen im Serum und Plasma stark miteinander zusammenhängen.

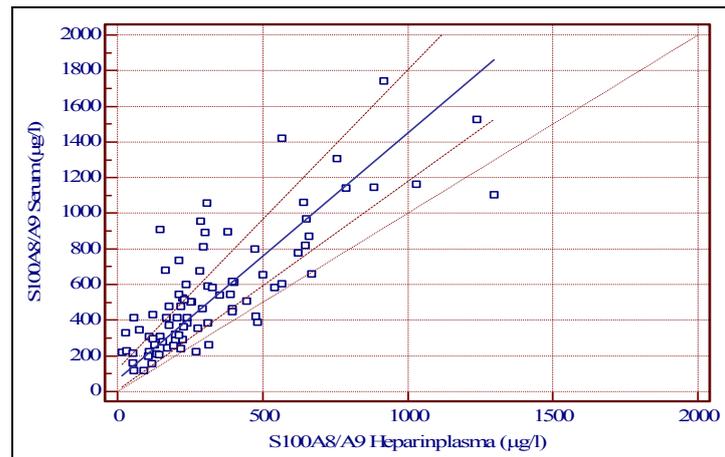


Abbildung 13

S100A8/A9-Konzentration im Serum im Vergleich zu Heparinplasma. Die Passing-Bablok-Regression ist: $y=68,5(6,90 \text{ bis } 127)+1,38(1,17 \text{ bis } 1,68) x$. Die Angaben in Klammern entsprechen den 95 % Konfidenzintervallen.

Die Tabellen 16 und 17 bieten einen Überblick über die ermittelten Korrelationen in den Patientenkollektiven.

In der Patientengruppe ohne Karzinomerkrankung (BPH-Patienten) zeigte sich als einzige weitere Korrelation ein inverser Zusammenhang zwischen der S100A9-Konzentration und der %fPSA-Konzentration ($r = -0,46$; $P < 0,01$). In der Patientengruppe mit Karzinomerkrankung lassen sich die Korrelationen wie folgt zusammenfassen:

1. Die S100A9-Konzentration im Serum zeigte einen positiven Zusammenhang zur S100A8/A9-Konzentration im Serum ($r = 0,22$; $P < 0,05$) und eine Tendenz zur Korrelation im Plasma ($r = 0,26$; $P = 0,055$).
2. Die S100A8- und S100A9-Konzentrationen korrelierten signifikant miteinander ($r = 0,27$; $P < 0,05$).
3. Die S100A8-Konzentration korrelierte mit der fPSA-Konzentration ($r = 0,23$; $P < 0,05$) und dem Prostatavolumen ($r = -0,28$; $P < 0,05$).

Tabelle 16. Korrelationen zwischen den S100-Protein-Konzentrationen und den klinischen Kenngrößen bei BPH-Patienten.

Angabe der Korrelationen als Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzen: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

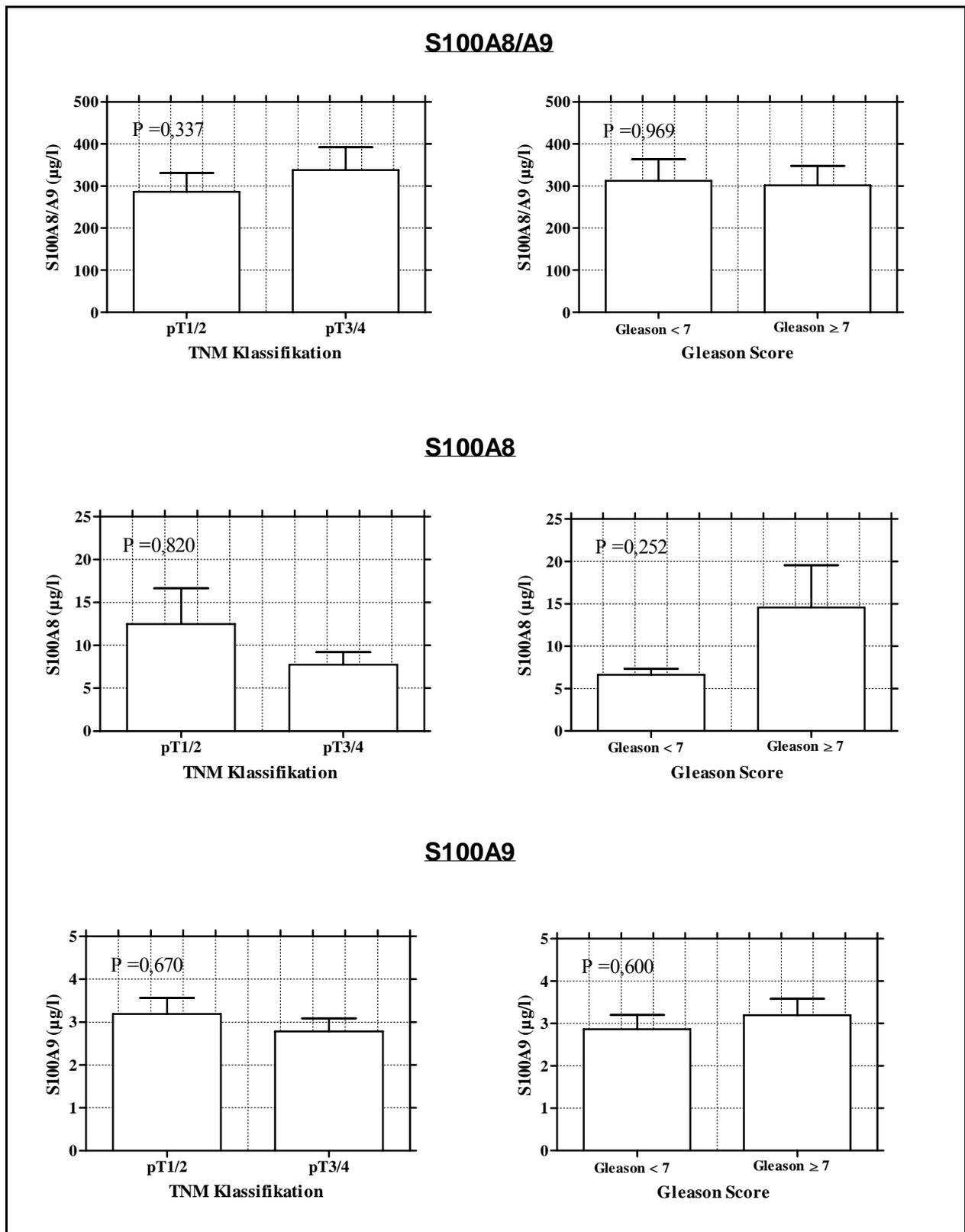
	S100A8/A9 S+	S100A9 LiH	S100A8 LiH
Alter	0,01	0,08	-0,14
TRUS	0,03	-0,14	-0,07
PSA	0,01	0,11	-0,06
fPSA	0,09	-0,19	-0,13
%fPSA	0,15	-0,46 **	-0,08
S100A8/A9 LiH	0,88 **	-0,14	-0,29
S100A8/A9 S+		-0,01	-0,05
S100A9 LiH	-0,01		0,20
S100A8 LiH	-0,05	0,20	

Tabelle 17. Korrelationen zwischen der S100-Protein-Konzentrationen und den klinischen Kenngrößen bei Karzinom-Patienten.

Angabe der Korrelationen als Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikanzen: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

	S100A8/A9 S+	S100A9 LiH	S100A8 LiH
Alter	0,08	0,01	-0,12
TRUS	-0,05	-0,08	-0,28 *
TNM	-0,04	0,07	0,21
Gleason Summe	-0,02	0,14	0,07
PSA	-0,05	-0,03	0,18
fPSA	-0,16	-0,03	0,23 *
%fPSA	0,09	0,13	0,03
S100A8/A9 LiH	0,71 **	0,26	-0,09
S100A8/A9 S+		0,22 *	0,11
S100A9 LiH	0,22 *		0,27 *
S100A8 LiH	0,11	0,27 *	

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die S100-Protein-Konzentrationen im Zusammenhang mit dem Tumorstadium stehen, wurden die Patienten ohne Metastasen nach dem Tumorstadium in pT1-2 (n=30) und pT3-4 (n=20) und nach dem histologischen Differenzierungsgrad (Gleason-Score < 7, n=25; Gleason \geq 7, n=25) klassifiziert. Der statistische Vergleich zwischen den jeweiligen Gruppen wurde aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bestanden nicht (Abb. 14). Dies bestätigt die fehlenden signifikanten Korrelationen in Tabelle 17.

**Abbildung 14**

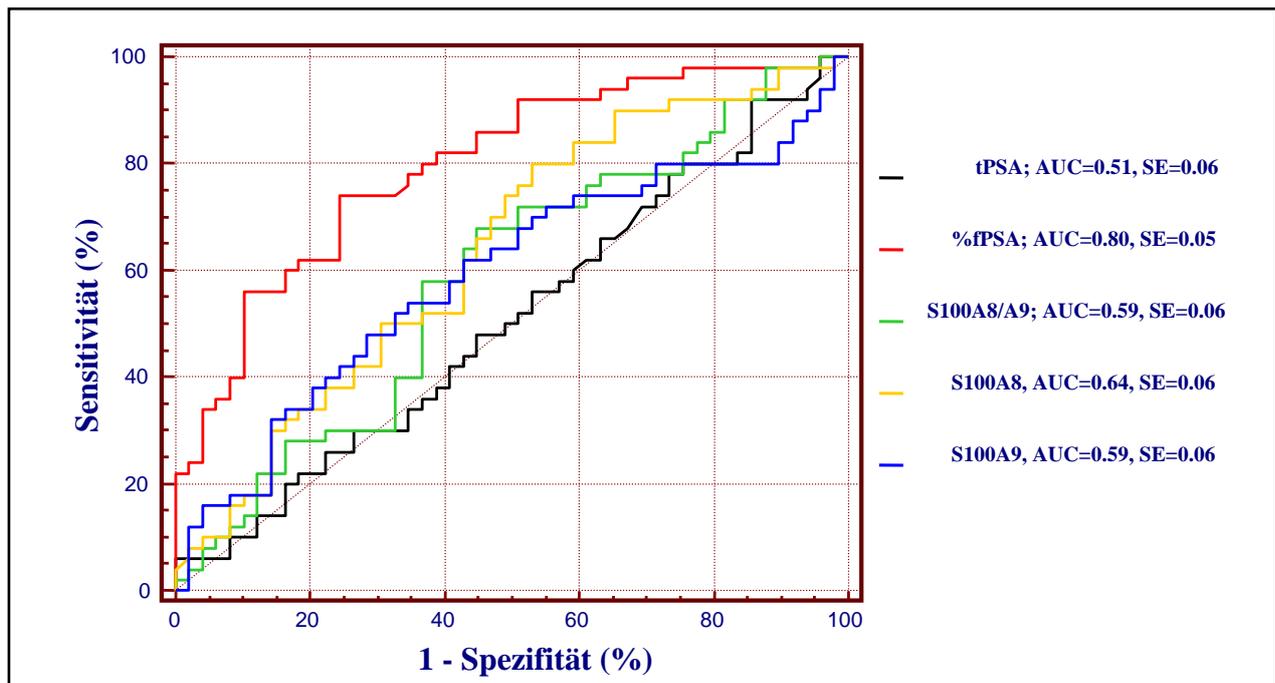
S100-Protein-Konzentration in Beziehung zum TNM-Stadium und histologischen Differenzierungsgrad. Im Mann-Whitney-U-Test zeigten sich in allen Vergleichen keine Signifikanzen (siehe P-Werte).

Aus diesen Berechnungen kann somit geschlussfolgert werden, dass weder das Alter noch das jeweilige Tumorstadium oder der Tumorgrad die Konzentration von S100A8/A9 und der Monomere S100A8 und S100A9 beeinflussen.

4.2.4. Bewertung der S100-Protein-Messungen mit Hilfe von ROC-Analysen

Zur Bewertung der diagnostischen Aussage der S100-Protein-Bestimmungen wurden ROC-Analysen durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob mit den S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen im Bereich ≤ 20 $\mu\text{g/l}$ tPSA eine bessere Differenzierung zwischen der Diagnose BPH und PCa gelingt, als dies mit den Kenngrößen tPSA und %fPSA möglich ist. Zu diesem Zweck erfolgte der Vergleich der jeweils ermittelten AUC miteinander. In die Untersuchung wurden nur die PCa-Patienten ohne Metastasen (n=50) eingeschlossen. Zur Vermeidung eines Verifikationsfehlers wurden, wie bereits vorher erläutert, 50 BPH-Patienten mit ähnlichen tPSA-Werten für die Vergleiche benutzt. Abbildung 15 stellt alle ROC-Kurven und die dazugehörigen AUC-Werte dar.

Für die S100-Protein-Werte zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den tPSA-Werten. Somit erlauben sie im Bereich ≤ 20 $\mu\text{g/l}$ tPSA keine Unterscheidung zwischen Patienten mit und ohne PCa. Die AUC für %fPSA war im Vergleich zu allen anderen Werten signifikant höher ($P < 0,05$) und bietet in dieser Studie die beste Unterscheidungsmöglichkeit zwischen BPH- und PCa-Patienten.

**Abbildung 15**

ROC-Kurven mit den entsprechenden AUC-Werten für die tPSA- und %fPSA-Bestimmungen im Vergleich zu den S100A8/A9-, S100A8-, S100A9-Messungen bei BPH- und PCa-Patienten.

4.2.5. Verlauf der postoperativen S100-Protein-Konzentration

Zur Untersuchung der S100-Protein-Eliminationskinetik erfolgte die Bestimmung der S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentration in den zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Prostatektomie gewonnenen Serumproben (Zeitplan der Entnahmen siehe S. 18). Es wurden zudem die CrP-, tPSA- und fPSA-Konzentrationen ermittelt, um Vergleiche zu entzündlichen Geschehen und schon bekannten Eliminationskinetiken zu ziehen.

Die tPSA- und fPSA-Konzentrationen zeigten den mit der Entnahme der Prostata erwarteten, typischen postoperativen Abfall, während die CrP-Konzentration 5 h nach Organentnahme operationsbedingt stark ansteigt (Abb. 16). Die S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Die S100A8-Konzentrationen lagen bei den meisten Proben unter der Nachweisgrenze und sind somit in den Abbildungen nicht wiedergegeben.

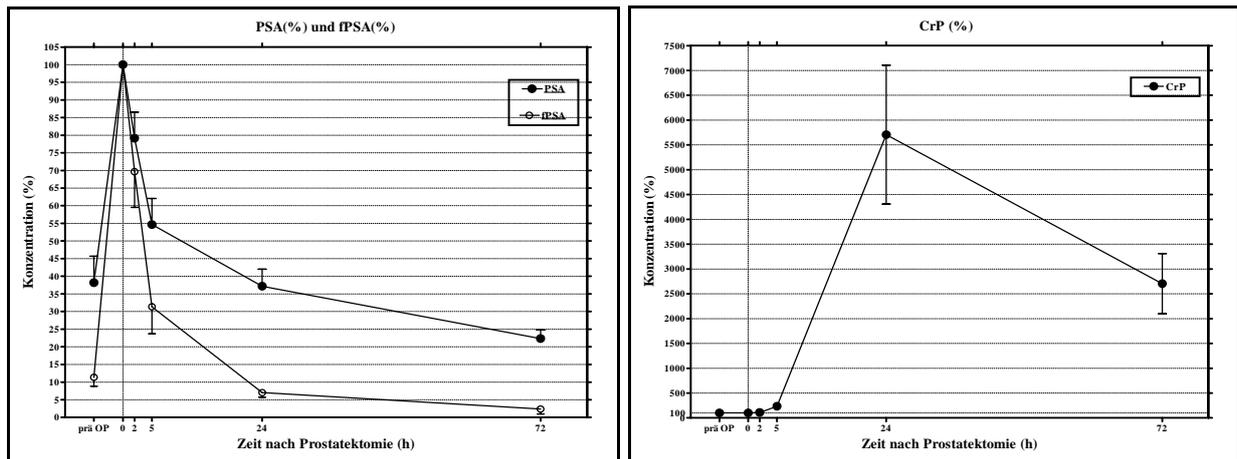


Abbildung 16

Veränderung der tPSA-, fPSA- und CrP-Konzentration im Serum von 6 Patienten nach radikaler Prostatektomie. Die Werte zum Zeitpunkt der Organentnahme (0 h) wurden 100 % gleichgesetzt. Dargestellt wurden die Mittelwerte \pm SEM.

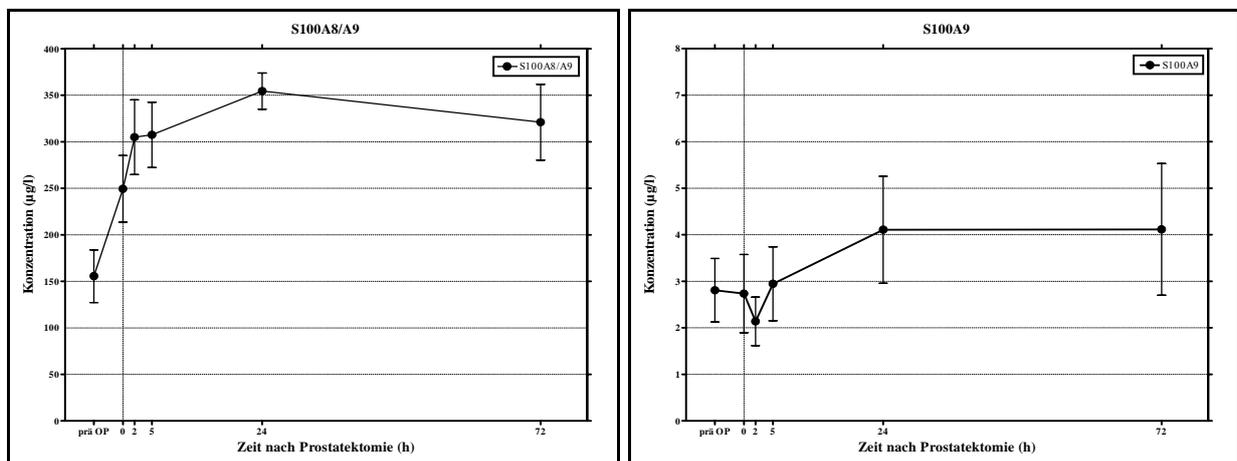


Abbildung 17

Veränderung der S100A9- und S100A8/A9-Konzentration im Serum von 6 Patienten nach radikaler Prostatektomie. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurden die Werte in $\mu\text{g/l}$ belassen. Dargestellt wurden die Mittelwerte \pm SEM.

Eine statistische Auswertung der ermittelten S100A9- und S100A8/A9-Werte erfolgte mit Hilfe des Friedman-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests. Sie zeigten für die S100A8/A9-Konzentration einen statistisch signifikanten Konzentrationsanstieg nach 24 h im Vergleich zum Zeitpunkt der Organentnahme ($P < 0,05$). Für die S100A9-Konzentration ergaben sich keine statistisch signifikanten Konzentrationsänderungen, eine Tendenz zu leicht höheren Werten lässt sich aber aus der Abb. 16 erkennen.

Um die Beobachtungen der Eliminationskinetik des S100A9 und S100A8/A9 nach Prostatektomie mit einem andersartigen Patientenkollektiv zu vergleichen, wurden Messungen bei vier Patienten vorgenommen, die aufgrund eines Nierenzellkarzinoms nephrektomiert wurden. Die Blutentnahme erfolgte zu denselben Zeitpunkten wie bei den Prostatektomien. In

den Serumproben wurden S100A8, S100A9 und S100A8/A9 bestimmt. Die Verläufe der S100-Protein-Konzentrationen nach der Nephrektomie verhielten sich ähnlich wie die bei den Prostatektomien beobachteten Kinetiken. Die Konzentrationen sowohl der Monomere wie auch des Dimers stiegen postoperativ an und erreichten ihre höchste Konzentration 72 h nach dem Eingriff (Abb. 18).

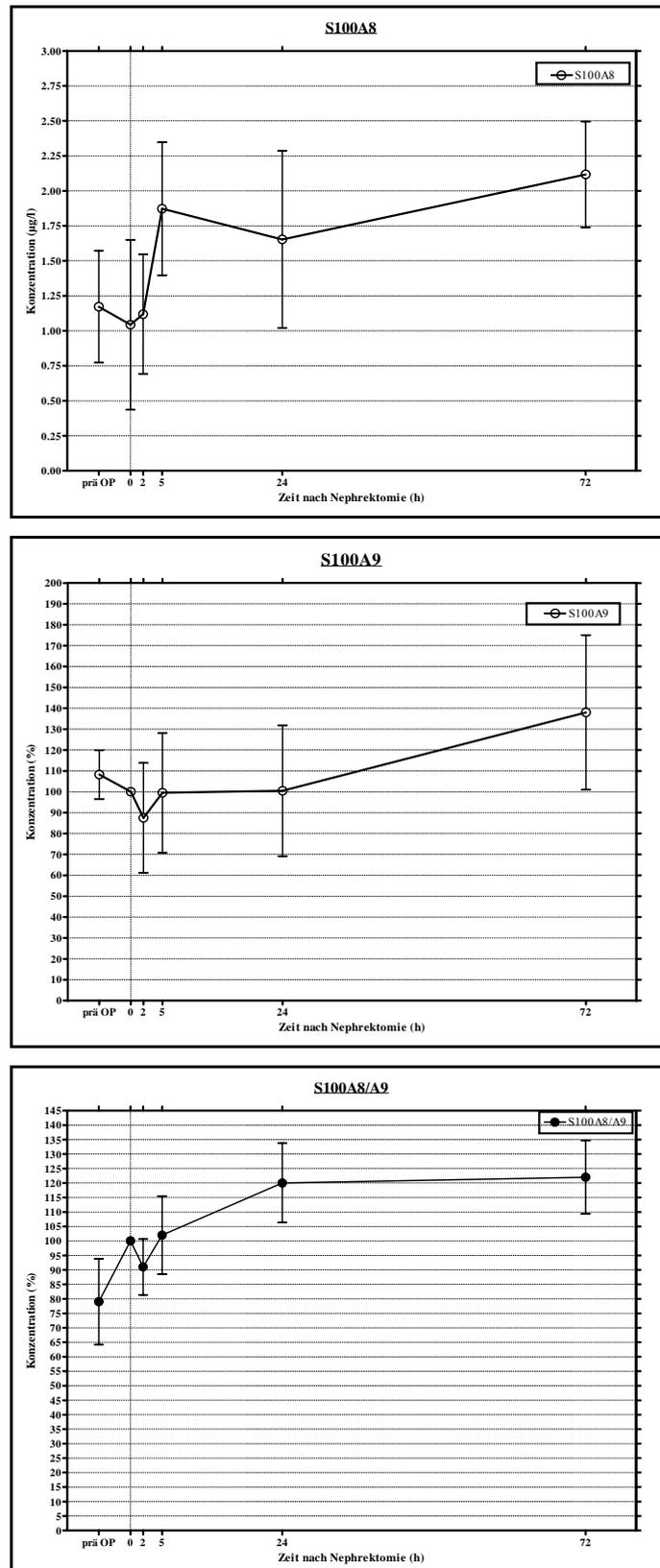


Abbildung 18

Veränderung der S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen im Serum von 4 Patienten nach Nephrektomie. Die Werte für S100A8/A9 und S100A9 zum Zeitpunkt der Organentnahme (0 h) wurden 100 % gesetzt. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurden die Werte für S100A8 in µg/l belassen. Dargestellt wurden die Mittelwerte \pm SEM.

Die Konzentrationsänderungen wurden mit Hilfe des Friedman-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet. Ein statistisch signifikanter Anstieg ergab sich im U-Test allein für die S100A8/A9-Konzentration nach 72 h im Vergleich zum präoperativ gemessenen Werte ($P < 0.05$). Die Konzentrationen der Monomere S100A8 und S100A9 zeigten keine statistisch signifikanten postoperativen Veränderungen.

5. Diskussion

Gemäß den in der Einleitung und der Aufgabenstellung beschriebenen Zielsetzungen dieser Dissertationsschrift und den dargestellten Ergebnissen sollen im Diskussionsteil zuerst die Aspekte „präanalytische Einflussgrößen“, „diagnostische Validität“ und „Eliminationskinetik“ diskutiert werden. Anschließend möchte ich auf die Zukunft der Prostatakarzinomdiagnostik eingehen.

5.1. Präanalytische Einflußgrößen

Bisher wurde in den vorliegenden Arbeiten zur S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Bestimmung offenbar wenig Augenmerk auf die zu beachtenden präanalytischen Bedingungen und Einflussgrößen gelegt. Systematische Untersuchungen, z.B. zum Einfluss von Serum und Plasma auf die gemessenen Konzentrationen, fehlen bisher. Auch sind die von den Herstellern in den Anleitungen zu den ELISA-Testsystemen gegebenen Informationen, was diese Fragestellungen angeht, eher vage und oft auch widersprüchlich. So wird von den Autoren der Firma Immundiagnostik mit dem Hinweis auf die von ihnen angenommene bessere Konstanz in den gemessenen Konzentrationen das Verwenden von Serum empfohlen [113], während die Firma Hycult aufgrund der höheren S100A8/A9-Serumkonzentrationen EDTA-Plasma empfiehlt [114]. Die Firma Bühlmann erwähnt ebenfalls von ihr beobachtete höhere S100A8/A9-Werte im Serum, gibt aber keine Empfehlungen für das zu verwendende Probenmaterial [115]. Die Firma BMA macht in ihren Testvorschriften keine Angaben hinsichtlich des zu verwendenden Testmaterials und der möglichen präanalytischen Einflussgrößen [116,117]. Die Angaben zur Probenaufbereitung unterscheiden sich zudem von den von mir gemachten Beobachtungen. So lagen die von mir aufgrund von vorangegangenen Untersuchungen verwendeten Verdünnungsverhältnisse immer unter denen, die von den Testkits der Firmen empfohlen werden.

In der Literatur finden sich Angaben darüber, welche Auswirkung die Probengewinnung auf die S100-Protein-Konzentration haben könnte nur in einer Studie von Dale aus dem Jahre 1990 [118]. Er konnte in dieser Arbeit zeigen, dass die S100A8/A9-Konzentration in EDTA-Plasma niedriger ist als die im Serum und sich überdies auch zeitlich konstant verhält. Aus diesen Beobachtungen heraus empfahl Dale die Verwendung von EDTA-Plasma zur Bestimmung der S100A8/A9-Konzentration, da diese Werte seiner Meinung nach am ehesten

die in vivo herrschenden Verhältnisse widerspiegeln [118]. In allen anderen vorstehend zitierten Publikationen gibt es keine solchen Angaben zur speziellen Wahl des Probenmaterials. Lediglich in der von Fagerhol et al. [119] durchgeführten Studie zur Calprotectin-Bestimmung bei Ausdauerläufern wurde auf die von Dale gemachten Beobachtungen näher eingegangen. Somit ist die Annahme berechtigt, dass in den meisten Studien die Wahl des Probenmaterials aufgrund rein organisatorischer Gesichtspunkte erfolgte.

In der vorliegenden Schrift wurde im Abschnitt 4.1.2. die signifikant höhere S100A8/A9-Konzentration im Serum gegenüber Plasma beschrieben. Diese Feststellung deckt sich, wie gerade dargestellt, mit den Ergebnissen von Dale, der eine um mehr als das Doppelte erhöhte S100A8/A9-Konzentration im Serum beobachtete [118]. Dale vermutete in seiner Arbeit, dass es aufgrund der Koagulation zu einer erhöhten S100A8/A9-Freisetzung aus den Granulozyten kommt, während EDTA einen stabilisierenden Effekt auf S100A8/A9 und auf die Granulozytenmembran auszuüben scheint [118]. Von gerinnungsbedingten Veränderungen in der Blutzusammensetzung muss bei der Verwendung von Serum generell ausgegangen werden, da nachweislich die Zell-Lyse im Serum verstärkt ist [120]. Somit wären auch die erhöhten S100A8/A9-Konzentrationen im Serum zu erklären, da die Zell-Lyse das in hohen Konzentrationen im Zytosol der Granulozyten befindliche S100A8/A9 freisetzen würde. Ob EDTA überdies positive Effekte auf die Granulozytenmembran ausübt, war meiner Kenntnis nach noch nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Bei der Verwendung von Plasma muss aber auch beachtet werden, dass die Bindung von Metallionen durch EDTA und Citrat Störungen in den Messergebnissen hervorrufen kann, wie dies z.B. bei Metalloproteinasen oder der alkalischen Phosphatase beobachtet wird [120]. Da S100A8/A9 Kalzium bindet und dadurch seine Konformation ändert und stabiler gegenüber Hitze und Proteolyse wird [52], könnte man annehmen, dass die im EDTA- und Citrat-Plasma gemessene S100A8/A9-Konzentration aufgrund des Fehlens von Kalzium im Vergleich zu der in vivo zu beobachtenden Konzentration vermindert ist. Ein Entzug von Kalzium durch die EDTA- oder Citrat-Bindung könnte den S100A8/A9-Heterokomplex destabilisieren und nicht, wie Dale vermutete, stabilisieren. Genauere Rückschlüsse auf den Effekt von EDTA auf die S100A8/A9-Konzentration könnte man z.B. mit Untersuchungen zum Verhalten der Konzentration unter EDTA-Zusatz gewinnen. Dies war jedoch nicht Gegenstand meiner Untersuchungen, zumal die Entscheidung zur Wahl des Probenmaterials auch ohne diese detaillierteren Untersuchungen zu treffen war.

Mit den Tests der Firma Bühlmann und Hycult wurde außerdem beobachtet, dass Lithium-Heparin-Plasma eine signifikant höhere S100A8/A9-Konzentration aufwies als EDTA-

und Citrat-Plasma. Wie im Abschnitt 4.2.2. dargestellt, wurde im hier beschriebenen Patientenvergleich die S100A8/A9-Konzentration im Lithium-Heparin-Plasma gemessen. Die im Heparin-Plasma gemessenen Werte waren signifikant höher als im EDTA- oder Citrat-Plasma. Man könnte vermuten, dass dies ein Effekt der oben angesprochenen Kalziumbindung durch EDTA und Citrat ist. Die im Heparin-Plasma gemessenen Konzentrationen waren somit weder durch gerinnungsbedingte Prozesse beeinflusst, noch muss eine Verfälschung des Ergebnisses durch Kalziumbindung vermutet werden. Daher ist davon auszugehen, dass die ermittelten S100A8/A9-Werte den in-vivo-Konzentrationen entsprechen.

Bei der Bestimmung der Monomere S100A8 und S100A9 konnten wir keine Unterschiede zwischen Serum und Plasma nachweisen. In der Literatur ließen sich ebenfalls keine Untersuchungen zu diesem Thema finden. Die Konzentration dieser Monomere scheint also unabhängig vom Probenmaterial zu sein.

Ein Anstieg der Konzentration bei Aufbewahrung der Proben zwischen 30 min und 4 h vor Zentrifugation wurde nicht beobachtet. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bei einer Bearbeitung von Proben unter standardgemäßen Laborbedingungen die Ergebnisse nicht durch präanalytische Störgrößen verfälscht sind.

Die in Abschnitt 4.1.3. dargestellte Untersuchung zeigte, dass ein mehrmaliges Einfrieren und Auftauen derselben Probe zu einem Anstieg der S100-Konzentration sowohl im Serum als auch im Plasma führt. Ein Anstieg durch Freisetzung von S100-Proteinen aus noch im Serum und Plasma verbliebenen korpuskulären Elementen kann jedoch ausgeschlossen werden, da wir durch zweimaliges Zentrifugieren ein zellfreies Serum und Plasma erhalten haben. Es bleibt aber festzuhalten, dass man für die Untersuchung der S100A8- und S100A9-Konzentrationen keine mehrmals aufgetauten/eingefrorenen Proben verwenden sollte.

Ein weiteres Problem besteht meiner Meinung darin, dass andere Autoren in ihren Studien entweder auf selbst konzipierte ELISA-Testsysteme oder auf die von den verschiedensten Firmen angebotenen Systeme zur Bestimmung der S100-Proteine zurückgreifen [108,119,121-124]. Zieht man in Betracht, dass sich schon die von uns verwendeten Testsysteme in den gemessenen S100A8/A9-Konzentrationen oft drastisch unterscheiden, lässt sich dies auch von den anderen Tests vermuten. Gründe für diese Konzentrationsunterschiede – der Test der Firma Bühlmann ermittelte zum Teil bis zu 6fach höhere Konzentrationen als die Testsysteme der Firma Hycult und Immundiagnostik – bestehen vermutlich in unterschiedlichen Kalibrationen. Der Einsatz unterschiedlicher Standards und sich unterscheidender rekombinanter Proteine für die S100A8/A9-Bestimmung sowie die Verwendung unterschiedlichster Reagenzien sind weitere Quellen, die zu differierenden Messergebnissen führen. Dies und das Fehlen von

standardisierten Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der S100A8-, S100A9- und S100A8/A9-Konzentration erschweren in meinen Augen den objektiven Vergleich der unterschiedlichen Studien.

In Anbetracht der Anzahl von Arbeiten, welche sich mit der Bestimmung von S100-Proteinen im Serum und Plasma beschäftigen, sollten deshalb standardisierte Bedingungen für deren Bestimmung so schnell wie möglich festgelegt werden. Aufgrund der sich doch stark unterscheidenden Konzentrationen im Serum und Plasma sollten verbindliche Empfehlungen ausgesprochen werden, in welchem Probenmedium die S100-Konzentration zu bestimmen ist. Darüber hinaus sollte beachtet werden, dass die zu untersuchenden Blutproben möglichst innerhalb von 4 h nach Entnahme zentrifugiert und am selben Tag bestimmt werden. Ist eine Bestimmung innerhalb dieser Zeitspanne nicht möglich, sollten die Serum- bzw. Plasmaproben bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt werden. Detailliertere Empfehlungen kann ich auf Grund der vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht ableiten. Dazu müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass nur Proben verwendet werden, die vorher noch nicht aufgetaut wurden.

5.2. Diagnostische Validität von S100A8, S100A9 und S100A8/A9-Komplex im Vergleich zu konventionellen PCa-Markern

Zahlreiche Studien der letzten Zeit legten den Verdacht nahe, dass Proteine der S100-Familie eine wichtige Rolle bei der Entstehung von epithelialen Tumoren beim Menschen spielen [99-101]. Dabei wird davon ausgegangen, dass Änderungen in der Expression und Funktion der S100-Proteine einen wichtigen Schritt während der Tumorgenese darstellen [50]. Da S100A8/A9-positive myeloide Zellen in epitheliale Tumorgewebe nachgewiesen wurden, lässt sich weiterhin eine Rolle in der entzündungsassoziierten Karzinogenese vermuten [50].

Hermani et al. zeigten, wie in der Einleitung beschrieben, eine Überexpression der S100-Proteine S100A8 und S100A9 in malignem Prostatagewebe. Diese Autoren brachten darüber hinaus die S100A9-Konzentration als möglichen neuen Serummarker zur Unterscheidung zwischen malignen und benignen Prostataerkrankungen in die Diskussion [42]. Da aufgrund der in der Einleitung dargestellten Limitationen der PSA-Konzentration ein dringender Bedarf nach neuen, eine Prostatakarzinomerkrankung schon in ihrer Frühphase entdeckenden Markern besteht, wurden diese neuen Untersuchungsergebnisse mit viel Interesse aufgenommen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Resultate widersprechen jedoch den Ergebnissen von Hermani et al. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Autoren zeigten die hier

vorgestellten Untersuchungen nicht diese Unterschiede in den S100A9- und S100A8/A9-Konzentrationen bei Prostatakarzinompatienten im Vergleich zu Patienten mit benigner Prostatahyperplasie. Die S100A8-Konzentration im Plasma von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie war vielmehr signifikant höher als die bei Prostatakarzinompatienten. Es zeigten sich außerdem signifikant höhere S100A8/A9-Konzentrationen im Plasma von BPH-Patienten im Vergleich zu Karzinompatienten mit Lymphknotenmetastasen. Während also Hermani et al. eine diagnostische Validität der S100A9-Serumkonzentration für die Differenzierung zwischen maligner und benigner Prostataerkrankung nachweisen konnten [42], zeigte die für diese Untersuchung durchgeführte ROC-Analyse, dass die Serum- und Plasma-Konzentrationen aller drei S100-Proteine keine bessere Differenzierung zwischen maligner und benigner Prostataerkrankung erlauben.

Trotz der von uns beobachteten signifikanten Unterschiede in den S100A8/A9-Konzentrationen zwischen Patienten mit metastasiertem und nicht-metastasiertem Prostatakarzinom war die Konzentration der S100-Proteine unabhängig von der Tumordifferenzierung und dem Tumorgrad. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es keine Korrelation mit klinischen Parametern wie Prostatavolumen und tPSA-Konzentration gab.

Die Unterschiede zu den von Hermani et al. erhobenen Befunden in der gemessenen S100A9-Konzentration können nicht mit unterschiedlichen Testbedingungen erklärt werden, da für den S100A9-Nachweis dasselbe ELISA-Testsystem der Firma BMA verwendet wurde. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die S100A8- und S100A8/A9-Konzentrationen ähnlich der S100A9-Konzentration verhalten. Damit wurden diese Unterschiede gegenüber den Ergebnissen von Hermani et al. auch an diesen Analyten bestätigt. Für die S100-Messungen wurden in der vorliegenden Arbeit Serum- und Plasmaproben verwendet, während die andere Arbeitsgruppe nur Serum einsetzte. Da sich aber in den Voruntersuchungen gezeigt hat, dass nur die Konzentration des Heterokomplexes von dem verwendeten Probenmaterial abhängt, die S100A8/A9-Konzentration jedoch nicht von Hermani et al. untersucht wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die dargestellten Unterschiede nicht durch das verschiedene Probenmaterial bedingt sein können. Zusätzlich habe ich für meine Arbeit ein dem tPSA-Wert gemäß gepaartes Patientenkollektiv verwendet. Dadurch wurde ein sog. Verifikationsfehler verhindert [111,112]. Die Resultate meiner Untersuchungen zeigten außerdem, dass der Parameter %fPSA eine den S100-Proteinen und der tPSA-Konzentration überlegene Unterscheidung zwischen malignen und benignen Prostataerkrankungen erlaubt. Obwohl es heute allgemein akzeptiert ist, dass die %fPSA-Konzentration die PCa-Diagnostik – im Vergleich zur alleinigen Anwendung der tPSA-Konzentration – entscheidend verbessert [24,34],

geschlossen Hermani et al. [42] den %fPSA Wert nicht in ihrer Studie ein. Sollen heutzutage neue Marker für die Diagnostik untersucht werden, so besteht die Notwendigkeit, deren diagnostische Validität immer mit der Validität der zurzeit besten Marker zu vergleichen [106]. Dieser Vergleich wurde durch Hermani et al. nicht vorgenommen. Die in der Publikation von Hermani et al. dargestellten Flächen unter den ROC-Kurven für tPSA und S100A9 differierten jedoch nur geringfügig. Die Unterschiede waren wesentlich weniger ausgeprägt, als man sie sonst im Vergleich von tPSA und %fPSA nachweisen kann. Allein deshalb kann angenommen werden, dass Hermani et al. auch in ihrer Studie beim Vergleich mit %fPSA-Werten deutlich bessere ROC-Daten erzielt hätten als mit den S100A9-Werten. Ich möchte deshalb schlussfolgern, dass die Bestimmung von S100A8, S100A9 oder des S100A8/A9-Komplexes eine geringere Diskriminationsfähigkeit zwischen Prostatakarzinom und BPH aufweist als der Parameter %fPSA. Dieses Ergebnis wurde von uns inzwischen auch in der Fachzeitschrift "Prostate" publiziert, sodass die Daten von Hermani et al. durch meine Reevaluations-Studie entsprechend in Zweifel zu ziehen sind [125].

5.3. Eliminationskinetik

Um eine mögliche Assoziation der S100-Proteine S100A8, S100A9 und S100A8/A9 mit dem Prostatagewebe zu prüfen, wurden Untersuchungen zur Eliminationskinetik durchgeführt. Es wird dabei davon ausgegangen, dass aus einem Organ freigesetzte Komponenten dann im zirkulierenden Blut vermindert auftreten bzw. sogar total verschwinden, wenn das Organ durch eine Operation entfernt wird. Deshalb wurde das Verhalten dieser S100-Konzentrationen im Serum von Patienten vor und nach Prostatektomie untersucht. Während die tPSA- und fPSA-Konzentrationen nach Prostatektomie wie erwartet abfielen [126], war für die S100-Proteine ein Anstieg der Serumkonzentration zu beobachten. Die S100A8/A9-Konzentration war 24 h nach der radikalen Prostatektomie signifikant höher. Bei der S100A9-Konzentration war eine Tendenz zu höheren postoperativen Werten ersichtlich.

In der Kontrollgruppe von Patienten nach radikaler Nephrektomie ergab sich ein ähnliches Bild. Die Konzentration der beiden Monomere S100A8 und S100A9 zeigte postoperativ eine Tendenz zu höheren Werten, während S100A8/A9 72 h postoperativ signifikant erhöht war.

Der für das PSA typische Konzentrationsabfall nach Prostatektomie konnte also weder für die Monomere noch für den von ihnen gebildeten Heterokomplex beobachtet werden [126]. Wenn man bedenkt, dass die gemessenen S100-Proteine vor allem Entzündungsmarker sind [45],

dann spiegelt der in dieser Arbeit beobachtete postoperative Konzentrationsanstieg aller Wahrscheinlichkeit nach die postoperative Akut-Phase-Reaktion mit Monozyten- und Granulozytenaktivierung als Reaktion auf das chirurgische Trauma wider. Dies wurde auch schon in anderen Untersuchungen gezeigt [127]. Während jedoch das gleichzeitig gemessene CRP nach 72 h bereits abfiel, verblieben die S100A9- und S100A8-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt auf erhöhten Werten gegenüber den Ausgangsdaten vor der Operation. Wie meine Untersuchungen gezeigt haben, verhalten sich die Eliminationskinetiken der S100-Proteine bei Patienten nach radikaler Nephrektomie sehr ähnlich. Daraus ist nach meiner Ansicht klar ersichtlich, dass nicht das Prostatagewebe, sondern andere Quellen hauptsächlich für die S100-Protein-Konzentrationen im Blut verantwortlich sind. Michael et al. [128] haben in Untersuchungen zur Elimination des "Macrophage Migration Inhibitory Factor" (MIF) bei einer ähnlichen Fragestellung diese Methodik eingesetzt, um zu klären, ob die Komponente im Blut nach Entfernung der Prostata vermindert ist. Auch dort konnte nachgewiesen werden, dass dieser Analyt nur in sehr geringem Maße durch eine radikale Prostatektomie beeinflusst wird und somit kaum als Prostatakarzinommarker geeignet erscheint.

5.4. Ausblick zur weiteren Entwicklung der Diagnostik des Prostatakarzinoms

Das Ziel einer Krebsvorsorgeuntersuchung ist es, eine maligne Erkrankung bereits in ihrem Frühstadium zu erkennen, um möglichst schnell eine kurative Behandlung einleiten zu können. Überdies sollte diese möglichst nicht-invasiv und kostengünstig durchführbar sein, um eine breite Anwendung zu ermöglichen. Eine hohe Spezifität für die spezielle Tumorentität stellt zudem eine wichtige Anforderung an jeden neuen Marker dar. Aus der Erkenntnis, dass jede Krebsart ein heterogenes Krankheitsbild darstellt, lässt sich somit schließen, dass nicht einzelne Marker, sondern eine Gruppe mehrerer Marker, welche in ihrer Gesamtheit die höchste Sensitivität und Spezifität für die untersuchte Krankheitsentität aufweisen, zukünftig in der Diagnosefindung eingesetzt werden [129].

Für die adäquate Entwicklung neuer Biomarker haben Pepe et al. [129] Empfehlungen erarbeitet. Sie gliederten den Prozess in 5 Phasen, wobei am Anfang prä-klinische Untersuchungen zu speziellen Merkmalen der untersuchten Tumorentität stehen sollten. Beginnend müssen Besonderheiten in Genexpressionsmustern, Proteinexpression oder spezifischen Antikörpern erkannt werden, wobei jedoch darauf geachtet werden sollte, dass diese Veränderungen z.B. auch im Blut nachweisbar sind, da alle invasiven Verfahren zu aufwendig und kostenintensiv für ein breites, populationsbasiertes Screeningprogramm sind. Als nächster

Schritt sollte die Entwicklung eines klinischen Assays auf Grundlage von nicht-invasiv gewonnenem Material erfolgen und dessen Nutzen getestet werden. Die Eignung des Markers, prä-klinische Erkrankungen zu identifizieren, sollte mit Hilfe einer retrospektiven, longitudinalen Studie untersucht werden, und eine prospektive Untersuchung sollte die Detektionsrate des Markers ermitteln. In der letzten Phase der Entwicklung muss geklärt werden, ob es mit Hilfe des untersuchten Markers gelingt, die krankheitsspezifische Mortalität zu senken. Dabei sollte auch darauf geachtet werden, dass die untersuchte Krankheit aufgrund des neuen Tests nicht überdiagnostiziert wird. Man versteht darunter das Diagnostizieren von Krankheiten, die ohne den neuen Test klinisch nicht in Erscheinung getreten wären und in manchen Fällen auch eigenständig eine Regression gezeigt hätten [130].

Die flächendeckende Einführung des PSA-Screenings hat leider solch ein Überdiagnostizieren von Prostatakarzinomen mit sich gebracht [131]. Schätzungen von Zappa et al. [132] ergaben, dass bei einem Prostatakarzinomscreening mit einem PSA-Cutoff von $>4 \mu\text{g/l}$ und DRE, 51 % der 60 jährigen und 93 % der 65 jährigen Patienten überdiagnostiziert werden. McGregor et al. [133] berechneten überdies, dass 84 von 100 Prostatakarzinompatienten nicht vor dem 85. Lebensjahr an dieser Erkrankung versterben werden. Es werden somit heute eine Vielzahl von Patienten therapiert, die eigentlich keiner Behandlung bedurft hätten, da sie nicht an einem Prostatakarzinom verstorben wären [134]. Es lässt sich also ableiten, dass sich die Kombination von digitaler-rektaler Untersuchung, PSA-Konzentration und transrektalem Ultraschall zwar in den letzten Jahren als nützliches Instrument in der Prostatakarzinomdiagnostik erwiesen hat, sie jedoch auch deutlich ihre Limitationen zeigt. Die Suche nach neuen, besser geeigneten Markern, besonders solchen für die Früherkennung des Prostatakarzinoms, ist deshalb eine besondere Herausforderung an die Forschung.

Für eine angemessene therapeutische Intervention ist es wichtig, bereits frühzeitig zwischen aggressiven und indolenten Prostatakarzinomen zu unterscheiden, besonders wenn man bedenkt, dass ein großer Teil dieser Tumore lokal begrenzt bleibt, während nur ein geringer Teil metastasiert [135]. Es besteht also weniger der Bedarf nach Markern, welche eine Prostatakarzinomerkrankung an sich erkennen, sondern vielmehr nach solchen, die zwischen indolenten und aggressiven Karzinomen unterscheiden können [134]. Bedenkt man aber, dass von der Entdeckung des PSA bis zu seiner routinemäßigen Einführung in die Prostatakarzinomdiagnostik rund 12 Jahre vergingen, so muss man ähnliche Zeitspannen auch für die Einführung neuer Marker veranschlagen [136].

Da sich aggressive Tumore vor allem in ihrem Potential zur Metastasierung auszeichnen, sollten die neuen Marker biologische Prozesse anzeigen, welche auf ein metastasierendes

Potential des Tumors hindeuten. Es sollte außerdem im Laufe der Tumorgenese eine Änderung der Expression oder des Expressionsmusters des neuen Markers erfolgen, damit dies als Zeichen einer sich entwickelnden Malignität gewertet werden kann.

Wenn also ein Augenmerk auf Marker gelegt werden soll, welche bereits frühzeitig aggressive Tumore anzeigen, muss darüber nachgedacht werden, welche Merkmale diese Tumore aufweisen werden. Einer der ersten Schritte zu Metastasierung besteht in der Abgrenzung vom lokalen Primärtumor, dem Erlangen einer gewissen Mobilität der Tumorzellen und der Invasion in das umliegende Gewebe [135]. Der damit einhergehende Verlust der Zell-Zell-Adhäsion stellt einen unverzichtbaren Schritt in dieser Progression vom nicht-invasiven zum invasiven Tumorstadium dar [137]. Da Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) wie E-Cadherin und N-Cadherin an diesem Prozess beteiligt sind, wurden sie bereits als potentielle Marker untersucht [138,139]. Leider kamen die bis dato durchgeführten Untersuchungen zu unterschiedlichen und sich teilweise widersprechenden Ergebnissen [135]. Caveolin 1, ein Protein der Signaltransduktion, sowie FAS und HER2 zeigen eine Überexpression beim Prostatakarzinom und sind somit Gegenstand weiterer Forschungen [134]. Die Untersuchungen zum Einsatz von Integrinen, Connexinen und Metalloproteinasen lieferten überdies einige vielversprechende Ergebnisse, jedoch müssen auch diese weiter kritisch diskutiert werden [135]. Als vielversprechender Test deutet sich ferner ein Urintest auf PCA3-DD3-mRNA an, da sich gezeigt hat, dass dieses Gen weitgehend prostatakarzinomspezifisch ist [136]. Es zeigt eine Überexpression von über 95 % in primärem PCa-Gewebe und liefert einen 90 % negativen prädiktiven Wert bei einer Serum-PSA-Konzentration von $>3 \mu\text{g/l}$ [140]. Es lässt sich also abschließend konstatieren, dass weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet dringend erforderlich sind, um über den Einsatz dieser Moleküle in der Prostatakarzinomdiagnostik zu entscheiden. Wie jedoch schon angemerkt, deutet sich künftig wohl eher der Einsatz dieser Marker in Kombination miteinander an, da sie höchstwahrscheinlich nur in ihrer Gesamtheit ein Bild über die Aggressivität eines Tumors liefern könnten.

Da die seit ca. zwei Jahrzehnten andauernde Suche nach neuen Prostatakarzinommarkern bis heute noch keine neuen, klinisch anwendbaren Ergebnisse geliefert hat, konzentrieren sich weitere Studien darauf, die Aussagekraft des PSA zu verbessern [141]. Neben den schon in der Einleitung besprochenen PSA-Subformen wird z.B. die Konzentration des gebundenen PSA (cPSA) und dessen Zusammenhang zum Prostatakarzinom analysiert. Da der größte Teil des cPSA an α -1-Antichymotrypsin (PSA-ACT) gebunden ist und dies aus bisher nicht geklärten Gründen im Serum von PCa-Patienten erhöht ist, wird dessen Anwendung zurzeit kritisch diskutiert, wobei jedoch gezeigt wurde, dass die Anwendung in Kombination mit der

tPSA-Konzentration keine bessere Spezifität als die PSA-Ratio bietet [136]. Als Indikatoren der Tumorprogression werden ferner die PSA-Verdopplungszeit und lokales Tumorwachstum untersucht, wobei jedoch auch diese keine adäquaten prognostischen und prädiktiven Marker sind [135].

Seit Beginn der PSA-Ära wird ferner kritisch über die sog. PSA-Velocity (PSAV), d.h. die Änderung der PSA-Konzentration in einem definierten Zeitraum, und deren Einsatz in der Prostatakarzinomfrüherkennung diskutiert. In vielen Studien konnte zwar eine Assoziation der PSAV mit aggressiven Tumorformen gezeigt werden, jedoch erlaubt auch sie keine verbesserte Diagnose in Kombination mit der PSA-Konzentration [142]. Sie ist somit in der Früherkennung vermutlich nicht von zusätzlichem Nutzen. In Anbetracht der Tatsache, dass derzeit noch viele verschiedene Methoden zur Berechnung der PSAV angewandt werden – Thompson et al. [143] konnten ca. 20 verschiedene Berechnungen aufführen – und dem Fakt, dass viele der sich mit der PSAV beschäftigenden Studien sich unterschiedlichster Standards bedienen, wird es wohl noch einige Zeit dauern, bis abschließend über die wahre Aussagekraft der PSAV entschieden werden kann.

Aus den bisher beschriebenen Daten und den Literaturrecherchen lässt sich meines Erachtens nur der Schluss ziehen, dass neue Marker, die in der Frühphase der Tumorgenese eine Differenzierung zwischen indolenten und aggressiven Karzinomen erlauben, zurzeit noch nicht vorhanden sind. Die Entwicklung solcher Indikatoren wird sicherlich trotz der inzwischen eingesetzten Hochdurchsatztechnologien einschließlich von massenspektrometrischen Untersuchungen noch einige Zeit in Anspruch nehmen, wie es auch Schröder [136] in seiner Arbeit zu Biomarkern in der Prostatakarzinomdiagnostik formuliert hat. Geht man weiterhin von der hohen Zahl von überdiagnostizierten Prostatakarzinomfällen aus, so bedeutet dies eine große Zahl an Überbehandlungen, und damit verbunden einen unnötigen Leidensdruck für die Patienten, sowie enorme Kosten für das Gesundheitssystem. Man sollte somit in Zukunft die Praxis des weit verbreiteten PCa-Screenings kritisch hinterfragen, besonders wenn man die ersten Ergebnisse des Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT) in Betracht zieht. Hierbei konnte klar gezeigt werden, dass kein PSA-Cutoff zwischen Hochrisikopatienten bzw. sog. high-grade Tumoren und Patienten, die ein geringes Prostatakarzinomrisiko besitzen, unterscheiden kann [143]. Angesichts dieser neuen Erkenntnisse stellt sich überdies vermehrt die Frage, ob nicht aktives Warten eine bessere Strategie in der Betreuung von prognostisch günstigen Prostatakarzinomfällen darstellt [144-146].

Der Medizin- und Wissenschaftsjournalist Klaus Koch hinterfragte in diesem Zusammenhang in seinem viel beachteten Artikel den Nutzen der PSA-gestützten

Früherkennung und stellte weiterhin die kontroverse Frage, ob die Operationen und Folgekomplikationen während der invasiven Behandlung des Prostatakarzinoms durch die geretteten Patienten aufgewogen werden könnten [147]. Natürlich lässt sich diese Sichtweise auf Grund der beschriebenen epidemiologischen Daten nachvollziehen, jedoch sollte man bei diesen Betrachtungen des Ganzen nicht den einzelnen Patienten aus dem Auge verlieren. Die Deutsche Urologische Gesellschaft (DGU) schrieb in diesem Zusammenhang, dass der PSA-Test, trotz seiner Limitationen, derzeit die einzige zur Verfügung stehende Früherkennungsuntersuchung ist, und dass, besonders in Anbetracht der konstant hohen Mortalitätsrate, es fahrlässig wäre, dem einzelnen Patienten diese Untersuchung zu versagen [148]. Da sich im Bezug auf die Lebensqualität nach radikaler Prostatektomie und Radiotherapie keine signifikanten Unterschiede zwischen den durch Früherkennung bzw. klinisch diagnostizierten Fällen andeutet und auch kein Zweifel daran bestehen kann, dass im Individualfall nur eine frühzeitige Diagnose und Therapie zur Heilung führt, ist sich die DGU sicher, dass die Vorteile der PSA-gestützten Früherkennung bei weitem die Nachteile überwiegen [148,149]. Wie die DGU jedoch feststellt, bleibt derzeit der beste Weg zur Detektion von Prostatakarzinomen weiter ungewiss [149].

Es lässt sich also abschließend feststellen, dass bei der weiteren Suche nach neuen Markern in der Prostatakarzinomdiagnostik ein stärkeres Augenmerk auf Diskriminierungsmöglichkeiten zwischen aggressiven und prognostisch günstigen Karzinomformen gelegt werden sollte, wobei zum einen diverse PSA-Subformen zunehmend in den Fokus der Forschung geraten und sich zum anderen der Einsatz multipler Marker andeutet. Im Bezug auf die Rolle der S100-Proteine in der Tumorgenese sollten weiterhin intensive Forschungen angestellt werden, damit die kontroversen Resultate aus den sich bisher mit diesem Thema beschäftigenden Arbeiten geklärt werden können. In meiner hier vorliegenden Arbeit habe ich jedoch gezeigt, dass die S100-Proteine S100A8, S100A9 und der von ihnen gebildete Heterokomplex S100A8/A9 wahrscheinlich keine Anwendung als Marker in der Prostatakarzinomdiagnostik finden werden. Aufgrund der engen Verknüpfung dieser Proteine mit dem unspezifischen angeborenen Immunsystem und den daraus resultierenden erhöhten Konzentrationen in den zirkulierenden Körperflüssigkeiten sollten sich weitere Forschungen meines Erachtens nach eher mit Expressionsmustern in malignem Gewebe und mit deren Rolle in der entzündungsassoziierten Karzinogenese beschäftigen.

6. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist mit seinen rund 50.000 Neuerkrankungen im Jahr die häufigste maligne Erkrankung des Mannes in Deutschland. In der Diagnostik dieser Erkrankung stellen die Bestimmung der Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Serum, die digitale-rektale Untersuchung und der transrektale Ultraschall die drei wichtigsten Instrumente dar. Jedoch können auch diese Untersuchungen nicht verhindern, dass entweder Tumore nicht entdeckt oder Patienten einer unnötigen Biopsie zugeführt werden. Vor allem der Fakt, dass das PSA zwar organ- aber nicht tumorspezifisch ist und es daher auch bei benignen Prostataerkrankungen erhöht im Serum vorkommen kann, stellt eine seiner wesentlichen Einschränkungen in der diagnostischen Aussagekraft dar. Deshalb ist die Einführung neuer Biomarker, welche eine bessere Unterscheidung zwischen malignen und benignen Prostataerkrankungen erlauben, ein vorrangiges Ziel der urologischen Forschung.

S100A8 und S100A9 – phagozytenspezifische, pro-inflammatorische Proteine der kalziumbindenden S100-Protein-Familie – wurden auf Grund ihrer erhöhten Expression im Prostatakarzinomgewebe jüngst als neue Marker in der Prostatakarzinomdiagnostik beschrieben. Zusätzlich wurde eine erhöhte S100A9-Konzentration im Serum von Prostatakarzinompatienten gefunden. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, diese Studie zu re-evaluieren, da diese S100-Proteine in der wissenschaftlichen Fachwelt und vor allem auch in der Laienpresse als ein Durchbruch in der Prostatakarzinomdiagnostik propagiert wurden. Meine Untersuchungen sollten sich jedoch nicht nur auf S100A8 und S100A9, sondern auch auf den von diesen beiden Proteinen gebildeten Heterokomplex S100A8/A9 beziehen. Untersucht wurden 140 Patienten, wobei als Untersuchungskollektiv Prostatakarzinompatienten und Patienten mit benigner Prostatahyperplasie mit vergleichbaren PSA-Werten gewählt wurden. Die Prostatakarzinomgruppe teilte sich wiederum in Patienten ohne Metastasen (n=50), mit Lymphknotenmetastasen (n=27) und Fernmetastasen (n=13) auf. Zum Vergleich der diagnostischen Aussagekraft der S100-Proteine wurden die konventionellen Parameter Gesamt-PSA und der %fPSA-Wert als Quotient von freiem PSA zu Gesamt-PSA herangezogen. Da bisher keine ausreichenden Daten zum Einfluss der Probengewinnung und dem zu untersuchenden Probenmaterial (Serum, Plasma) vorlagen, waren in Voruntersuchungen die eine Bestimmung beeinflussenden, präanalytischen Faktoren zu ermitteln. In Untersuchungen zur Eliminationskinetik dieser Proteine im Serum nach radikaler Prostatektomie sollte außerdem die Assoziation dieser Proteine mit dem Prostatagewebe geklärt werden.

Die präanalytischen Untersuchungen zeigten, dass die im Serum gemessenen S100A8/A9-Konzentrationen jeweils signifikant höher als die im Plasma waren. Eine mögliche Erklärung stellt die S100A8/A9-Freisetzung aus korpuskulären Elementen während der Gerinnung dar. Die Monomere S100A8 und S100A9 zeigten hingegen keine Konzentrationsunterschiede in Serum und Plasma. Es konnte überdies gezeigt werden, dass eine Lagerung der Proben für vier Stunden bei Raumtemperatur vor der Zentrifugation zu keiner Erhöhung der gemessenen Konzentrationen führt. Ein mehrmaliges Tauen und Frieren von Proben führt zu erhöhten S100-Protein-Konzentrationen. Um Fehlinterpretationen zu verhindern, sollte die Bestimmung der S100-Protein-Konzentration daher nur nach einmaligem Auftauen erfolgen.

Die Konzentrationen der S100-Proteine im Plasma der Kontrollgruppen waren entweder signifikant höher (S100A8; $P=0,0206$) oder zeigten zumindest die Tendenz zu höheren Werten im Vergleich zu den Prostatakarzinompatienten. Die Konzentrationen der S100-Proteine wiesen keine Korrelationen zur PSA-Konzentration oder zum Prostatavolumen auf. Es bestand weiterhin kein Zusammenhang zum TNM-Stadium oder zum histologischen Differenzierungsgrad der Tumore. Konzentrationsunterschiede zwischen den drei Prostatakarzinomgruppen waren zu vernachlässigen.

PSA und die S100-Proteine zeigten eine sich von einander unterscheidende Eliminationskinetik nach radikaler Prostatektomie. Die Konzentrationen der S100-Proteine stiegen an, während die des PSA kontinuierlich abfielen. Der Zusammenhang zwischen veränderten Konzentrationen von S100-Proteinen im Serum und malignen Prostataerkrankungen lässt sich somit nicht unmittelbar erkennen.

Receiver-Operating-Characteristics (ROC)-Analysen zeigten, dass im Vergleich mit der PSA-Konzentration die S100-Protein-Konzentration keine verbesserte Unterscheidung zwischen Patienten mit und ohne Prostatakarzinom ermöglicht. Die diagnostische Aussagkraft sowohl der Monomere S100A8 und S100A9 als auch die des Heterokomplexes S100A8/A9 waren signifikant schlechter als die der PSA-Ratio. Ein Einsatz dieser S100-Proteine in der Prostatakarzinomdiagnostik ist somit nicht gerechtfertigt.

Als Hauptergebnis meiner Untersuchungen kann ich mit dieser Arbeit feststellen, dass sich S100A8, S100A9 und S100A8/A9 nicht als Biomarker für die Unterscheidung zwischen malignen und benignen Prostataerkrankungen einsetzen lassen. Sie erfüllen nicht die Anforderungen, die an neue, verbesserte Marker in der Prostatakarzinomdiagnostik gestellt werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V. und das RKI, Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. <http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Doc/kid2006.pdf> (Accessed 26.07.2007).
2. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2007. Fachserie 12 Reihe 6.2.1, Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäuser 2005 (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). <https://www-ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=struktur,vollanzeige.csp&ID=1020156> (Accessed 26.07.2007).
3. Aus G, Abbou CC, Bolla M, Heidenreich A, Schmid HP, van PH, et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 2005;48:546-51.
4. Heidenreich A, Aus G, Abbou CC, Bolla M, Joniau S, Matveev V, Schmid H-P, Zattoni F. European Association of Urology 2007, Guidelines on Prostate Cancer. http://www.uroweb.org/fileadmin/user_upload/Guidelines/07_Prostate_Cancer_2007.pdf (Accessed 26.07.2007).
5. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2007. Fachserie 12 Reihe 4, Todesursachen in Deutschland, Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen 2005. <https://www-ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=struktur,vollanzeige.csp&ID=1017241> (Accessed 26.07.2007).
6. Ebert T, Bendhack ML. [Prostatic carcinoma--diagnosis, hormone therapy, radio- and chemotherapy]. *Urologe A* 1997;36:570-7.
7. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006. Bevölkerung Deutschlands bis 2050, 11. koordinierte Bevölkerungsberechnung. <https://www-ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cBroker.cls?cmspath=struktur,vollanzeige.csp&ID=1020576> (Accessed 26.07.2007).
8. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
9. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17:337-47.
10. Zaridze DG, Boyle P. Cancer of the prostate: epidemiology and aetiology. *Br J Urol* 1987;59:493-502.
11. Carter HB, Piantadosi S, Isaacs JT. Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J Urol* 1990;143:742-6.
12. Meyer F, Bairati I, Shadmani R, Fradet Y, Moore L. Dietary fat and prostate cancer survival. *Cancer Causes Control* 1999;10:245-51.

13. Giovannucci E, Michaud D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology* 2007;132:2208-25.
14. Kasper JS, Giovannucci E. A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2056-62.
15. Börgermann C, Rübgen H. Früherkennung des Prostatakarzinoms. *Dtsch Arztebl* 2006;103:2399-406.
16. Gerber GS, Chodak GW. Routine screening for cancer of the prostate. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:329-35.
17. Philip J, Dutta RS, Ballal M, Foster CS, Javle P. Is a digital rectal examination necessary in the diagnosis and clinical staging of early prostate cancer? *BJU Int* 2005;95:969-71.
18. Macias DJ, Sarabia MJ, Sklar DP. Male discomfort during the digital rectal examination: does examiner gender make a difference? *Am J Emerg Med* 2000;18:676-8.
19. Ellis WJ, Chetner MP, Preston SD, Brawer MK. Diagnosis of prostatic carcinoma: the yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography. *J Urol* 1994;152:1520-5.
20. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res* 2004;10:3943-53.
21. Lundwall A, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, et al. A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biol Chem* 2006;387:637-41.
22. 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. *JAMA* 1995;274:1214-20.
23. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349:215-24.
24. Stephan C, Jung K, Lein M, Sinha P, Schnorr D, Loening SA. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1133-47.
25. Bunting PS. A guide to the interpretation of serum prostate specific antigen levels. *Clin Biochem* 1995;28:221-41.
26. Mikolajczyk SD, Song Y, Wong JR, Matson RS, Rittenhouse HG. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? *Clin Biochem* 2004;37:519-28.
27. Stamey TA. Preoperative serum prostate-specific antigen (PSA) below 10 microg/l predicts neither the presence of prostate cancer nor the rate of postoperative PSA failure. *Clin Chem* 2001;47:631-4.

28. 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.
29. 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.
30. 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. 1990. *J Urol* 2002;167:966-73.
31. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $<$ or $=$ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004;350:2239-46.
32. Lodding P, Aus G, Bergdahl S, Frosing R, Lilja H, Pihl CG, et al. Characteristics of screening detected prostate cancer in men 50 to 66 years old with 3 to 4 ng./ml. Prostate specific antigen. *J Urol* 1998;159:899-903.
33. 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.
34. 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.
35. 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. *JAMA* 1995;274:1214-20.
36. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998;279:1542-7.
37. Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC, Subong EN, 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;48:55-61.
38. Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA* 1997;277:1452-5.
39. Kwiatkowski MK, Recker F, Piironen T, Pettersson K, Otto T, Wernli M, et al. In prostatism patients the ratio of human glandular kallikrein to free PSA improves the discrimination between prostate cancer and benign hyperplasia within the diagnostic "gray zone" of total PSA 4 to 10 ng/mL. *Urology* 1998;52:360-5.
40. Becker C, Piironen T, Pettersson K, Bjork T, Wojno KJ, Oesterling JE, et al. Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of human glandular kallikrein 2 (HK2) in serum. *J Urol* 2000;163:311-6.

41. Recker F, Kwiatkowski MK, Piironen T, Pettersson K, Lummen G, Wernli M, et al. The importance of human glandular kallikrein and its correlation with different prostate specific antigen serum forms in the detection of prostate carcinoma. *Cancer* 1998;83:2540-7.
42. Hermani A, Hess J, De SB, Medunjanin S, Grobholz R, Trojan L, et al. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:5146-52.
43. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003;60:540-51.
44. Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 2002;7:d1356-d1368.
45. Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta* 2004;344:37-51.
46. Moroz OV, Antson AA, Dodson EJ, Burrell HJ, Grist SJ, Lloyd RM, et al. The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002;58:407-13.
47. Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* 2003;24:155-8.
48. Heizmann CW. Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. *Gen Physiol Biophys* 1992;11:411-25.
49. Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 1996;21:134-40.
50. Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1622-31.
51. Gebhardt C, Breitenbach U, Tuckermann JP, Dittrich BT, Richter KH, Angel P. Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:4266-76.
52. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997;50:113-23.
53. Sampson B, Fagerhol MK, Sunderkotter C, Golden BE, Richmond P, Klein N, et al. Hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet* 2002;360:1742-5.
54. Bouma G, Coppens JM, Lam-Tse WK, Luini W, Sintnicolaas K, Levering WH, et al. An increased MRP8/14 expression and adhesion, but a decreased migration towards proinflammatory chemokines of type 1 diabetes monocytes. *Clin Exp Immunol* 2005;141:509-17.

55. Lackmann M, Rajasekariah P, Iismaa SE, Jones G, Cornish CJ, Hu S, et al. Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. *J Immunol* 1993;150:2981-91.
56. Passey RJ, Xu K, Hume DA, Geczy CL. S100A8: emerging functions and regulation. *J Leukoc Biol* 1999;66:549-56.
57. Propper C, Huang X, Roth J, Sorg C, Nacken W. Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation. *J Biol Chem* 1999;274:183-8.
58. Strupat K, Rogniaux H, Van DA, Roth J, Vogl T. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000;11:780-8.
59. Santhanagopalan V, Hahn BL, Dunn BE, Weissner JH, Sohnle PG. Antimicrobial activity of calprotectin isolated from human empyema fluid supernatants. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76:285-90.
60. Sohnle PG, Hunter MJ, Hahn B, Chazin WJ. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis* 2000;182:1272-5.
61. Sorg C. The calcium binding proteins MRP8 and MRP14 in acute and chronic inflammation. *Behring Inst Mitt* 1992;126-37.
62. Yui S, Mikami M, Yamazaki M. Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. *J Leukoc Biol* 1995;58:650-8.
63. Sander J, Fagerhol MK, Bakken JS, Dale I. Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest* 1984;44:357-62.
64. Wilson GB, Jahn TL, Fonseca JR. Demonstration of serum protein differences in cystic fibrosis by isoelectric focusing in thin-layer polyacrylamide gels. *Clin Chim Acta* 1973;49:79-91.
65. Wilkinson MM, Busuttill A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, Van H, V. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J Cell Sci* 1988;91 (Pt 2):221-30.
66. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 1987;330:80-2.
67. Andersson KB, Sletten K, Berntzen HB, Dale I, Brandtzaeg P, Jellum E, et al. The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. *Scand J Immunol* 1988;28:241-5.
68. Andersson KB, Sletten K, Berntzen HB, Fagerhol MK, Dale I, Brandtzaeg P, et al. Leukocyte L1 protein and the cystic fibrosis antigen. *Nature* 1988;332:688.

69. Leukert N, Vogl T, Strupat K, Reichelt R, Sorg C, Roth J. Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. *J Mol Biol* 2006;359:961-72.
70. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin Mol Pathol* 1996;49:M74-M79.
71. Clohessy PA, Golden BE. His-X-X-X-His motif in S100 protein, calprotectin: relation to microbistatic activity. *J Leukoc Biol* 1996;60:674.
72. Loomans HJ, Hahn BL, Li QQ, Phadnis SH, Sohnle PG. Histidine-based zinc-binding sequences and the antimicrobial activity of calprotectin. *J Infect Dis* 1998;177:812-4.
73. Dale I, Fagerhol MK, Naesgaard I. Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem* 1983;134:1-6.
74. Kelly SE, Hunter JA, Jones DB, Clark BR, Fleming S. Morphological evidence for calcium-dependent association of calgranulin with the epidermal cytoskeleton in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* 1991;124:403-9.
75. Kligman D, Hilt DC. The S100 protein family. *Trends Biochem Sci* 1988;13:437-43.
76. Manitz MP, Horst B, Seeliger S, Strey A, Skryabin BV, Gunzer M, et al. Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. *Mol Cell Biol* 2003;23:1034-43.
77. Roth J, Burwinkel F, van den BC, Goebeler M, Vollmer E, Sorg C. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood* 1993;82:1875-83.
78. Newton RA, Hogg N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol* 1998;160:1427-35.
79. Eue I, Pietz B, Storck J, Klempt M, Sorg C. Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. *Int Immunol* 2000;12:1593-604.
80. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem* 1997;272:9496-502.
81. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97:889-901.
82. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 2000;275:40096-105.

83. Seeliger S, Vogl T, Engels IH, Schroder JM, Sorg C, Sunderkotter C, et al. Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in inflammatory muscle diseases. *Am J Pathol* 2003;163:947-56.
84. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull* 2003;26:753-60.
85. Haga HJ, Brun JG, Berntzen HB, Cervera R, Khamashta M, Hughes GR. Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus* 1993;2:47-50.
86. Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B, FitzGerald O. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1676-85.
87. Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, FitzGerald O, Sorg C, et al. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol* 1999;26:2523-8.
88. Strasser F, Gowland PL, Ruef C. Elevated serum macrophage inhibitory factor-related protein (MRP) 8/14 levels in advanced HIV infection and during disease exacerbation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;16:230-8.
89. Luger N, Stoll R, Kucharzik T, Burmeister G, Sorg C, Domschke W. Serum 27E10 antigen: a new potential marker for staging HIV disease. *Clin Exp Immunol* 1995;101:249-53.
90. Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 2005;46:256-69.
91. Homann C, Garred P, Graudal N, Hasselqvist P, Christiansen M, Fagerhol MK, et al. Plasma calprotectin: a new prognostic marker of survival in alcohol-induced cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:979-85.
92. Aadland E, Fagerhol MK. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:823-5.
93. Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:14-22.
94. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di PL, Cartabellotta F, Cavataio F, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem* 2003;49:861-7.
95. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, et al. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis* 2003;35:642-7.

96. Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Forgacs I, Bjarnason I. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease. *Gastroenterology* 2002;123:450-60.
97. Thjodleifsson B, Sigthorsson G, Cariglia N, Reynisdottir I, Gudbjartsson DF, Kristjansson K, et al. Subclinical intestinal inflammation: an inherited abnormality in Crohn's disease relatives? *Gastroenterology* 2003;124:1728-37.
98. Limburg PJ, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Devens ME, Harrington JJ, et al. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2831-7.
99. Arai K, Teratani T, Kuruto-Niwa R, Yamada T, Nozawa R. S100A9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: S100A9 expression in adenocarcinoma is closely associated with poor tumour differentiation. *Eur J Cancer* 2004;40:1179-87.
100. Arai K, Teratani T, Nozawa R, Yamada T. Immunohistochemical investigation of S100A9 expression in pulmonary adenocarcinoma: S100A9 expression is associated with tumor differentiation. *Oncol Rep* 2001;8:591-6.
101. Arai K, Yamada T, Nozawa R. Immunohistochemical investigation of migration inhibitory factor-related protein (MRP)-14 expression in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2000;17:183-8.
102. Kristinsson J, Nygaard K, Aadland E, Barstad S, Sauar J, Hofstad B, et al. Screening of first degree relatives of patients operated for colorectal cancer: evaluation of fecal calprotectin vs. hemocult II. *Digestion* 2001;64:104-10.
103. Gilbert JA, Ahlquist DA, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Rubin J, Ellefson RD. Fecal marker variability in colorectal cancer: calprotectin versus hemoglobin. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:1001-5.
104. Limburg PJ, Devens ME, Harrington JJ, Diehl NN, Mahoney DW, Ahlquist DA. Prospective evaluation of fecal calprotectin as a screening biomarker for colorectal neoplasia. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2299-305.
105. Ott HW, Lindner H, Sarg B, Mueller-Holzner E, Abendstein B, Bergant A, et al. Calgranulins in cystic fluid and serum from patients with ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:7507-14.
106. Kattan MW. Judging new markers by their ability to improve predictive accuracy. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:634-5.
107. Okegawa T, Kinjo M, Watanabe K, Noda H, Kato M, Miyata A, et al. The significance of the free-to-complexed prostate-specific antigen (PSA) ratio in prostate cancer detection in patients with a PSA level of 4.1-10.0 ng/mL. *BJU Int* 2000;85:708-14.
108. Homann C, Christensen E, Schlichting P, Philipsen EK, Graudal NA, Garred P. Ascites fluid and plasma calprotectin concentrations in liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:415-20.

109. Sobin LH, Wittekind Ch. TNM Classification of Malignant Tumours, 6th ed. New York: Wiley-Liss, 2002:172-175.
110. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974;111:58-64.
111. Jung K, Stephan C, Lein M, Brux B, Sinha P, Schnorr D, et al. Receiver-operating characteristic as a tool for evaluating the diagnostic performance of prostate-specific antigen and its molecular forms--What has to be considered? *Prostate* 2001;46:307-10.
112. Schroder FH, Kranse R. Verification bias and the prostate-specific antigen test--is there a case for a lower threshold for biopsy? *N Engl J Med* 2003;349:393-5.
113. Immundiagnostik AG. Calprotectin ELISA Kit. Anleitungsheft zum Test 08/2005.
114. HyCult biotechnology b.v. Human Calprotectin, ELISA TEST KIT HK325. Anleitungsheft zum Test 04/2005.
115. Bühlmann Laboratories AG MRP8/14 ELISA. Anleitungsheft zum Test 03/2004.
116. BMA Biomedicals AG MRP8 Enzyme Immunoassay S-1007. Anleitungsheft zum Test 09/2004.
117. BMA Biomedicals AG MRP14 Enzyme Immunoassay S-1008. Anleitungsheft zum Test 011/2004.
118. Dale I. Plasma levels of the calcium-binding L1 leukocyte protein: standardization of blood collection and evaluation of reference intervals in healthy controls. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50:837-41.
119. Fagerhol MK, Nielsen HG, Vetlesen A, Sandvik K, Lyberg T. Increase in plasma calprotectin during long-distance running. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65:211-20.
120. Guder WG, Nolte J. *Das Laborbuch für Klinik und Praxis*, 1 ed. München: Urban & Fischer Verlag, 2005:1-38.
121. Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkotter C, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:628-37.
122. Ikemoto M, Tanaka T, Takai Y, Murayama H, Tanaka K, Fujita M. New ELISA system for myeloid-related protein complex (MRP8/14) and its clinical significance as a sensitive marker for inflammatory responses associated with transplant rejection. *Clin Chem* 2003;49:594-600.
123. Mooren FC, Lechtermann A, Fobker M, Brandt B, Sorg C, Volker K, et al. The response of the novel pro-inflammatory molecules S100A8/A9 to exercise. *Int J Sports Med* 2006;27:751-8.

124. Frosch M, Vogl T, Seeliger S, Wulffraat N, Kuis W, Viemann D, et al. Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2622-6.
125. Ludwig S, Stephan C, Lein M, Loening SA, Jung K. S100A8, S100A9, and the S100A8/A9 complex in circulating blood are not associated with prostate cancer risk-A re-evaluation study. *Prostate* 2007;67:1301-7.
126. Lein M, Brux B, Jung K, Henke W, Koenig F, Stephan C, et al. Elimination of serum free and total prostate-specific antigen after radical retropubic prostatectomy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:591-5.
127. Berger D, Bolke E, Seidelmann M, Beger HG. Time-scale of interleukin-6, myeloid related proteins (MRP), C reactive protein (CRP), and endotoxin plasma levels during the postoperative acute phase reaction. *Shock* 1997;7:422-6.
128. Michael A, Stephan C, Kristiansen G, Burckhardt M, Loening SA, Schnorr D, et al. Diagnostic validity of macrophage migration inhibitory factor in serum of patients with prostate cancer: a re-evaluation. *Prostate* 2005;62:34-9.
129. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1054-61.
130. Woods WG, Tuchman M, Robison LL, Bernstein M, Leclerc JM, Brisson LC, et al. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet* 1996;348:1682-7.
131. Etzioni R, Penson DF, Legler JM, di TD, Boer R, Gann PH, et al. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:981-90.
132. Zappa M, Ciatto S, Bonardi R, Mazzotta A. Overdiagnosis of prostate carcinoma by screening: an estimate based on the results of the Florence Screening Pilot Study. *Ann Oncol* 1998;9:1297-300.
133. McGregor M, Hanley JA, Boivin JF, McLean RG. Screening for prostate cancer: estimating the magnitude of overdiagnosis. *CMAJ* 1998;159:1368-72.
134. Kumar-Sinha C, Rhodes DR, Yu J, Chinnaiyan AM. Prostate cancer biomarkers: a current perspective. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:459-70.
135. Mol AJ, Geldof AA, Meijer GA, van der Poel HG, van Moorselaar RJ. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:687-95.
136. Schroder FH. Biomarkers and screening for prostate cancer. *Ann Oncol* 2006;17 Suppl 10:x201-x206.
137. Stewart DA, Cooper CR, Sikes RA. Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:2.

138. Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A, Pienta KJ, Day ML. E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum Pathol* 2001;32:690-7.
139. Jaggi M, Nazemi T, Abrahams NA, Baker JJ, Galich A, Smith LM, et al. N-cadherin switching occurs in high Gleason grade prostate cancer. *Prostate* 2006;66:193-9.
140. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van O, I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van BB, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003;44:8-15.
141. Savage L. Is an improved PSA screening test in sight? *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1503-4.
142. Etzioni RD, Ankerst DP, Weiss NS, Inoue LY, Thompson IM. Is prostate-specific antigen velocity useful in early detection of prostate cancer? A critical appraisal of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1510-5.
143. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, et al. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:529-34.
144. Klotz L. Active surveillance with selective delayed intervention is the way to manage 'good-risk' prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2005;2:136-42.
145. Klotz L. Active surveillance with selective delayed intervention for favorable risk prostate cancer. *Urol Oncol* 2006;24:46-50.
146. Warlick C, Trock BJ, Landis P, Epstein JI, Carter HB. Delayed versus immediate surgical intervention and prostate cancer outcome. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:355-7.
147. Koch K. PSA-Test und Prostatakarzinom: Ein Beispiel für das Dilemma der Früherkennung. *Dtsch Arztebl* 2003;100:A2486-A2488.
148. Fornara P. PSA-Test: "Stimmungsmache". *Dtsch Arztebl* 2003;100:A2703.
149. Fornara P, Jurczok A. [PSA related screening of prostate cancer. Panic or improvement?]. *Aktuelle Urol* 2004;35:43-8.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Stefan Ludwig, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die S100-Proteine S100A8 und S100A9 sowie der Heterodimerkomplex S100A8/A9 im Serum und Plasma als Marker des Prostatakarzinoms - Untersuchungen zu präanalytischen Einflussfaktoren und zur diagnostischen Differenzierung zwischen benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, im November 2007

Stefan Ludwig

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein aufrichtigster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Jung, der mir diese Dissertation ermöglicht hat. Seine stets freundliche und hilfsbereite Betreuung, sowie seine Bereitschaft, mir jeder Zeit mit fachlichen Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite zu stehen, waren die entscheidenden Voraussetzungen für diese Arbeit. Zudem gehört Ihm mein Dank für die Ermöglichung der studentischen Forschungsförderung.

Herzlicher Dank gebührt weiterhin Prof. Dr. med. M. Lein und seiner Hilfe bei der Rekrutierung der Patienten für die Untersuchungen zur Eliminationskinetik. Überdies möchte ich PD Dr. med. C. Stephan für die Präsentation meiner Ergebnisse auf dem Nordkongress der Urologie Dank bekunden.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Silke Klotzek, deren fachliche Anweisungen bei der Labortätigkeit und die stets freundliche Unterstützung einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Dank gilt ebenso allen anderen Mitarbeitern der Urologischen Forschungsabteilung der Charité, die jederzeit bereit waren, mich mit Rat und Tat bei der Bewältigung dieser Arbeit zu unterstützen.

Ein besonderer Dank gilt schließlich meiner gesamten Familie, die mich während der Zeit des Studiums und der Promotion unterstützte und somit einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat.