

PCA3-RNA kwantificatie

***Een moleculair genetische test voor de vroegtijdige diagnose van
prostaatcarcinoom***

Kimy Emonds

promotor :

Prof. dr. Ivo LAMBRICHTS, dr. B. MAES

co-promotor :

Dr. J.L. RUMMENS

Inhoudstabel

Lijst met afkortingen	i
Lijst met figuren en tabellen	ii
Dankwoord	iv
Samenvatting	v
1. Inleiding	1
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Normale anatomie en histologie van de prostaat	1
1.3 Prostaataandoeningen	2
1.4 Risicofactoren	4
1.5 Diagnose en stagiëring	5
1.5.1 Symptomen	5
1.5.2 Klinisch Onderzoek – PPA	6
1.5.3 PSA-test.....	6
1.5.4 Echo –TRUS	7
1.5.5 Biopsie – TURP.....	7
1.5.6 CT-scan, botscan en MRI	8
1.6 Behandeling	8
1.7 Nieuwe biomarkers voor prostaatcarcinoom.....	9
1.7.1 DD3/PCA3	10
1.7.2 AMACR.....	11
1.8 Doelstelling	12
2. Materialen en Methodes	13
2.1 Stalen.....	13
2.2 RNA stabilisatie in urinesedimenten	13
2.3 RNA extractie en cDNA synthese	13
2.4 Conventionele RT-PCR voor GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR	15
2.5 Sequentiebepaling van GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR.....	15
2.5.1 Opzuivering van de RT-PCR producten	15
2.5.2 Sequencing reactie van de RT-PCR producten.....	16
2.6 Real-time RT-PCR voor GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR	17
2.7 Genormaliseerde en comparatieve kwantificatie: PCA3/GAPDH-, PCA3/PSA-, AMACR/GAPDH-, AMACR/PSA-testen	19
2.8 Statistische analyse.....	19
3. Resultaten	20
3.1 Ontwikkeling en optimalisatie van de kwantitatieve RT-PCR voor GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR	20
3.2 Expressie van PCA3 en AMACR in benigne en maligne prostaatweefsel.....	22
3.2.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test	22
3.2.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test.....	23

3.3 Expressie van PCA3 en AMACR in het benigne deel van een carcinoom bevattende prostaat	24
3.3.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test	24
3.3.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test.....	25
3.4 Bepaling van de diagnostische performantie van de PCA3/AMACR RT-PCR testen op prostaatweefsel	26
3.4.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test	26
3.4.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test.....	28
3.5 Expressie van PCA3 en AMACR in prostaatmassage vocht afkomstig van een benigne of maligne prostaat	29
3.5.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test	29
3.5.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test.....	30
3.6 Bepaling van de diagnostische performantie van de PCA3/AMACR RT-PCR testen op prostaatmassage vocht	31
3.6.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test	31
3.6.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test.....	32
3.6.3 Vergelijking van de PCA3/GAPDH-test met de klassieke serologische PSA-test	33
4. Discussie	35
Referenties.....	41

Lijst met afkortingen

BPH: Benigne Prostaat Hyperplasie
PIN: Prostatic intraepithelial neoplasia
MCM7: Minichromosome maintenance proteïne 7
PPA: Palpation Per Anum
DRE: Digital Rectal Examination
PSA: Prostaat Specifiek Antigen
hK3: Humaan Kallikrein 3
PPA: Palpatio Per Anum
PSAV: PSA Velocity
PSAD: PSA Density
TRUS: Transrectale ultrasonografie
TURP: Transurethrale prostaatrectie
CT: Computertomografie
MRI: Magnetic Resonance Imaging
PSMA: Prostate Specific Membrane Antigen
GRN-A: Chromogranin-1
GSTP-1: Glutathione-S-Transferase-1
PSCA: Prostate Stem Cell Antigen
IGF: Insulin-like Growth Factor
EPCA: Early Prostate Cancer Antigen
PCA-1: Prostate Cancer Antigen-1
PIM-1: Protooncogene proviral Insertion site in Moloney murine leukemia virus kinase
DD3: Differential Display Code 3
PCA3: Prostate Cancer Antigen 3
RT-PCR: Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
FP: Footprints
HMGI-Y: High-Mobility Group Protein-I(Y)
AMACR: α -Methylacyl-CoA Racemase
GAPDH: Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase
dNTP: deoxyNucleotide Polymeren
DTT: Dithiothreitol
PBS: Phosphate Buffered Saline
PUC: Puckered phosphatase
SLS: Sample Loading Solution
EDTA: Ethylene Diamine TetraAcetate
LNA: Locked nucleic acid
TBP: TATA box binding protein
PBGD: Porphobilinogen deaminase
AUC: Area under the curve

Lijst met figuren en tabellen

Figuren

Figuur 1: Schematische illustratie van de anatomie van de prostaat	2
Figuur 2: Schematische voorstelling van de celtypes in het humane prostaatepithelium	2
Figuur 3: Pathway voor prostaatkanker progressie	3
Figuur 4: Structuur van de PCA3 transcriptie eenheid	10
Figuur 5: Logaritmische relatieve PCA3-RNA expressie in benigne versus maligne prostaatweefsel	22
Figuur 6: Logaritmische relatieve AMACR-RNA expressie in benigne versus maligne prostaatweefsel.....	23
Figuur 7: Logaritmische relatieve PCA3-RNA expressie in benigne en maligne prostaatweefsel versus het benigne weefsel van een carcinomateuse prostaat.....	24
Figuur 8: Logaritmische AMACR-RNA expressie in benigne en maligne prostaatweefsel versus het benigne weefsel van een carcinomateuse prostaat.....	25
Figuur 9: ROC-curve van de relatieve PCA3-RNA expressie.....	26
Figuur 10: ROC-curve van de relatieve AMACR-RNA expressie	28
Figuur 11: Logaritmische relatieve PCA3-RNA expressie, genormaliseerd ten opzichte van GAPDH en PSA, in prostaatmassage vocht van patiënten met een benigne versus maligne prostaat	29
Figuur 12: Logaritmische relatieve AMACR-RNA expressie, genormaliseerd ten opzichte van GAPDH en PSA, in prostaatmassage vocht van patiënten met een benigne versus maligne prostaat	30
Figuur 13: ROC-curve van de relatieve PCA3-RNA expressie	31
Figuur 14: ROC-curve van de relatieve AMACR-RNA expressie.	32
Figure 15: ROC-curve van de serologische PSA-test.....	33
Figuur A: MCM7 immunohistochemische kleuring van benigne prostaatweefsel, PIN en prostaatscarcinoom weefsel	Bijlage 1
Figuur B: TNM-klassificatie voor prostaatscarcinomen	Bijlage 2
Figuur C: Relatie tussen de vetinname vanuit de voeding en mortaliteit ten gevolge van prostaatkanker	Bijlage 4

Tabellen

Tabel 1: cDNA synthese MIX1	14
Tabel 2: cDNA synthese MIX2	14
Tabel 3: Samenstelling van de conventionele RT-PCR-mix	15
Tabel 4: Samenstelling van het staalmix	16
Tabel 5: Samenstelling van de controlemix.....	16
Tabel 6: Aangewende primers voor de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR.....	17
Tabel 7: Aangewende probes voor de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR.....	18
Tabel 8: Samenstelling van de PCR-mix onder optimale condities.....	18
Tabel 9: Optimale primer-probe condities van de kwantitatieve RT-PCR reacties	21
Tabel 10: Resultaten van de RT-PCR specificaties voor de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR...	21
Tabel 11: Statistische parameters van de 4 diagnostische testen op prostaatweefsel	27
Tabel 12: Statistische parameters van de 4 diagnostische testen op prostaatmassage vocht.....	32

Tabel A: Voorstelling van de verschillende gleasongraden en desbetreffende tumortypes. ... Bijlage 3
Tabel B: Potentiële markers voor het prostaatcarcinoom Bijlage 5
Tabel C: Statistische parametrische waarden van de PCA3/GAPDH-test op prostaatweefsel bij alle
mogelijke cut-off waarden Bijlage 6
Tabel D: Statistische parametrische waarden van de PCA3/GAPDH-test op prostaatmassage vocht
bij alle mogelijke cut-off waarden..... Bijlage 7

Dankwoord

Na vier jaar is het dan zover, het einde van deze opleiding! Enerzijds zorgt dit voor een opluchtend gevoel van 'tot zover is het je toch al gelukt', anderzijds breekt nu een spannende maar toch mooie periode aan omdat een nieuwe en onbekende wereld voor je opengaat waar uitdagingen en levenservaringen je staan op te wachten. Maar voor het echte afscheid kan genomen worden, diende nog eerst de thesis te worden geschreven. Gedurende deze periode werd niet enkel hard, maar ook met het hart gewerkt, waardoor dit een onvergetelijke belevenis was en ook zal blijven. Al het werk en de stresserende momentjes die hier soms mee gepaard gingen, waren dus wel écht de moeite waard. Ondanks deze studie voor mij persoonlijk de voorbije vier jaar samenging met héél wat ups en downs, lijkt deze dan toch te eindigen met een happy end! Aangezien ik echter gedurende de opleiding er nooit alleen heb voorgestaan, wil ik via deze weg zeker nog een aantal personen een welverdiende dankjewel schenken.

In de eerste plaats wil ik hierbij mijn promotor Dr. Brigitte Maes bedanken, een welgemeende dankuwel voor alle raad en hulp die u me heeft gegeven en voor al die keren dat u klaar stond voor mij. Geen enkele vraag en geen enkel moment was u immers te veel, alhoewel dit zeker niet onbegrijpelijk zou geweest zijn. Hiernaast wil ik ook mijn dank geven aan mijn co-promotor Dr. Jean-Luc Rummens en interne promotor Ivo Lambrichts. Beiden stonden ook altijd paraat om, naast mijn promotor, een kritische kijk te geven op het verrichte schrijfwerk, hetgeen uiteindelijk geleid heeft tot een unieke en boeiende thesis.

Verder wil ik ook even mijn dank betuigen aan de afdeling moleculaire diagnostiek, waar ik voor het grootste deel mijn onderzoek heb uitgevoerd. Dankjewel Marijke, Rita, Lieve, Miet, An, Sabine, Remco, Karen en Hanne voor me geduldig bij te staan met al jullie raad in het labo. Zonder jullie zou de stage zeker niet van een leien dakje zijn gegaan. Eveneens wil ik hierbij Dr. Achten, Dr. Vekemans en het personeel van de afdeling pathologie en urologie bedanken voor hun bereidwillige en altijd sympathieke medewerking aan dit onderzoek. Uiteindelijk wil ik me toch ook nog even richten naar mijn collega-stagaires Tina, Ellen K. en Ellen D. Dankjewel voor de leuke babbeltjes en het plezier dat jullie me hebben bijgebracht tijdens deze stage periode.

Tot slot wil ik zeker nog die personen bedanken die niet enkel tijdens deze periode voor me klaarstonden, maar ook gedurende de voorbije vier jaren en zelfs al die jaren voordien. Dankjewel mama en papa dat jullie me de kans hebben gegeven om verder te studeren en om me te laten ontwikkelen tot de persoon die ik nu ben. Ook zal ik jullie voor altijd dankbaar zijn voor keer op keer in me te blijven geloven en me te steunen op al die momenten dat ik het het meest nodig had. Ik ben er dus ook van overtuigd en van bewust dat ik dit zonder jullie niet had kunnen bereiken. Proficiat mama en papa, jullie zijn hierbij dus ook afgestudeerd! Alsook wil ik langs deze weg mijn broer Niels heel fel bedanken om al die voorbije jaren een voorbeeld voor mij te zijn en me altijd bij te staan met zijn technische raad en daad. En ook al is hij er zich waarschijnlijk totaal niet van bewust, hij heeft altijd, op zijn eigen manier weliswaar, mij in mezelf doen geloven. Dankjewel hiervoor.

Nogmaals hartelijk bedankt iedereen!

Samenvatting

Prostaatkarcinoom vormt wereldwijd nog steeds een groot gezondheidsprobleem in de mannelijke bevolking. Ontwikkeling van methodes die de mogelijkheid bieden deze aandoening in een vroeg stadium te detecteren, zijn de dag van vandaag een prioriteit aangezien hierdoor verhoogde genezingskansen verzekerd worden. In deze studie werd getracht een sensitieve moleculair genetische test te ontwikkelen waarmee een overexpressie van PCA3- en AMACR-RNA gedetecteerd kan worden in zowel prostaatweefsel als prostaatmassage vocht.

Met behulp van RNA-extractie, reverse transcription en een real-time RT-PCR met TaqMan methodologie werden kwantitatieve RT-PCRs voor de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR ontwikkeld en geoptimaliseerd, waarmee het verschil in relatieve PCA3- en AMACR- expressie werd nagegaan tussen benigne en maligne prostaatweefsel. De RNA expressieniveaus van de genen GAPDH en PSA werden aangewend voor normalisatie van de resultaten. Uiteindelijk werden de testen klinisch gevalideerd zodat de diagnostische performantie op prostaatweefsel en prostaatmassage vocht kon worden gecontroleerd, en werd een vergelijking uitgevoerd met de klassieke serologische PSA-test.

Uit de resultaten van dit onderzoek werd een optimale prostaatweefseltest bekomen wanneer de RNA expressieniveaus van PCA3 en AMACR genormaliseerd werden ten opzichte van GAPDH. De sensitiviteit, specificiteit en positief- en negatief predictieve waarde van de PCA3/GAPDH- en AMACR/GAPDH-test (respectievelijk bij een cut-off waarde van 14 en 620) waren 90,0%, 87,5%, 81,8% en 92,3% versus 61,9%, 66,7%, 56,5% en 71,4%. Validatie van de ontwikkelde testen op prostaatmassage vocht vertoonde een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 66,7% en 72,4% (PCA3/GAPDH; cut-off = 4) én 50,0% en 69,0% (AMACR/GAPDH; cut-off = 4,5). De positief en negatief predictieve waarde bedragen tevens respectievelijk 27,3% en 87,5% én 23,1% en 86,4%. Vergelijking van de PCA3/GAPDH-test met de serologische PSA-test toonde een sensitiviteit, specificiteit en positief- en negatief predictieve waarde van respectievelijk 100%, 44,8%, 27,3% en 100% bij de klassieke test (cut-off = 4). Hieruit blijkt, zoals gekend, een zeer lage specificiteit van de PSA-test, welke beduidend lager is dan de in deze studie ontwikkelde niet-invasieve RT-PCR testen (op prostaat massage vocht).

In deze studie werd uiteindelijk de RT-PCR test voor kwantificatie van het PCA3-RNA (PCA3/GAPDH-test) aangeduid als zijnde een goede moleculaire genetische test voor de diagnose van prostaatkarcinoom, dit zowel op prostaatweefsel als op prostaatmassage vocht. In tegenstelling tot PCA3, blijkt AMACR een minder efficiënte biomarker voor de opsporing van prostaatkarcinoom.

Aangezien de PCA3/GAPDH-test zeer specifiek en sensitief prostaat tumorcellen kan aantonen in weefsel, kan dit een aanvullende test betekenen op de histopathologische technieken die klassiek worden toegepast voor de diagnose van prostaatkarcinoom.

Ook op prostaatmassage vocht lijkt de PCA3/GAPDH-test veelbelovend om een plaats te kunnen innemen in de vroegtijdige, niet-invasieve screening naar prostaatkarcinoom. De hoge negatief predictieve waarde van deze test suggereert een effectieve opvolging van patiënten met een verhoogd PSA gehalte en zou onnodige biopsienamen kunnen vermijden. Follow-up van de in deze studie geïnccludeerde patiënten en bijkomende analyse zijn noodzakelijk om de klinische toepasbaarheid van deze test op prostaatmassage vocht te valideren.

1. Inleiding

Prostaatkanker is een aandoening waarbij maligne cellen prolifereren in prostaatweefsel. Deze ziekte treft hierbij een relatief groot deel van de mannelijke bevolking en vormt één van de meest frequente doodsoorzaken wereldwijd. Verder kent dit type carcinoom meestal een trage evolutie, waardoor prostaatcarcinoom gerelateerde symptomen voornamelijk onopgemerkt blijven in een vroegtijdig stadium. Wanneer een detectie ook in latere stadia uitblijft, kunnen metastasen optreden.

Ondanks reeds veel onderzoek werd uitgevoerd naar prostaatcarcinogenese, kan nog steeds geen eenduidige verklaring geboden worden voor het verloop en de oorzaak van deze ziekte.

1.1 Epidemiologie

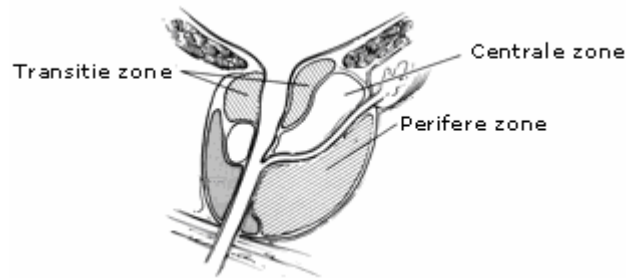
Prostaatkanker vormt een zeer groot gezondheidsprobleem in de Westerse wereld. In de Verenigde Staten vormt deze aandoening zowat één derde van alle nieuw gediagnosticeerde maligniteiten, in Vlaanderen één tiende. Maligne prostaattumoren blijken dus de meest frequent aangetroffen neoplasieën bij mannen. Verder wordt één man op zes op een bepaald punt in zijn leven getroffen door deze ziekte en wordt het prostaatcarcinoom aanzien als tweede voornaamste doodsoorzaak ten gevolge aan kanker.

De incidentie van prostaatkanker wordt momenteel geschat op 25,3 per 100000 wereldwijd. Deze incidentie kent een wereldwijde variabiliteit, hetgeen te wijten is aan genetische gevoeligheid, blootstelling aan gekende externe risicofactoren of verschillen in gezondheidszorg, en verschillen in de registratie van kanker. Hedendaags wordt de hoogste incidentie waargenomen in de Verenigde Staten, Canada en Scandinavië, de laagste in China en andere Aziatische regio's. Prostaatkanker mortaliteit varieert eveneens wereldwijd. Hierbij worden de hoogste sterftcijfers geconstateerd in de Caraïben, Scandinavië, Zuid- en Centraal Afrika, de laagste in China, Japan en landen van de voormalige Sovjetunie.

De incidentie van prostaatkanker wordt verwacht de komende decennia een snellere toename te kennen dan eender welke andere kanker. Er wordt zelfs verwacht dat de mannelijke bevolking, ouder dan 65 jaar, wereldwijd een viervoudige toename zal kennen de komende 5 decennia. Op basis hiervan wordt voorspeld dat deze toename zal leiden tot een aanzienlijke stijging in het aantal mannen waarbij het prostaatcarcinoom gediagnosticeerd wordt en waarbij een efficiënte behandeling nodig is voor het bestrijden van deze maligniteit.¹⁻⁷

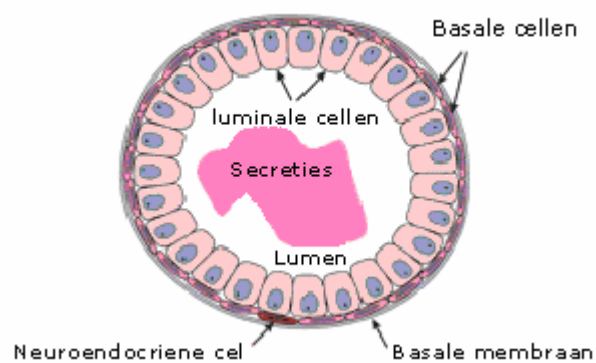
1.2 Normale anatomie en histologie van de prostaat

De prostaat, een klier gelegen rond de urethra aan de basis van de urineblaas, heeft als functie het secreteren van proteïnen aan de seminale vloeistof. In dit kleine orgaan kunnen drie morfologische gebieden onderscheiden worden (figuur 1): de perifere (70%), transitie (5%) en centrale zone (25%).



Figuur 1: Schematische illustratie van de anatomie van de prostaat⁸

Deze morfologische indeling is hierbij gebaseerd op de relatie van deze zones met prostaatkanker. Een goedaardige vergroting van de prostaat (benigne prostaat hyperplasie) wordt met name vooral gesitueerd in de transitie zone; kwaadaardige tumoren (prostaatcarcinomen) in de perifere zone. Verder bevat het prostaatepitheel tenminste drie celsoorten welke goed te onderscheiden zijn op basis van hun morfologie, functie en relevantie in prostaatcarcinogenese (figuur 2).



Figuur 2: Schematische voorstelling van de celtypes in het humane prostaatepithelium⁸

Het meest aanwezige celtype is de luminale cel welke androgeen afhankelijk is en instaat voor de productie van prostaat secretie proteïnen. Het tweede belangrijke celtype dat wordt aangetroffen is de basale cel die gelegen is tussen de luminale cellen en het onderliggende basale membraan. Naast een mogelijke stamcel functie, blijken deze cellen ook te beschikken over factoren die protectie bieden tegen DNA schade. Het derde celtype is de neuroendocriene cel, welke in een kleiner aantal wordt aangetroffen. Deze androgeen onafhankelijke cel zou instaan voor een paracriene signalering die de groei van luminale cellen bevordert. Een accumulatie van cellen met neuroendocriene eigenschappen blijkt karakteristiek te zijn voor agressieve vormen van prostaatkanker.

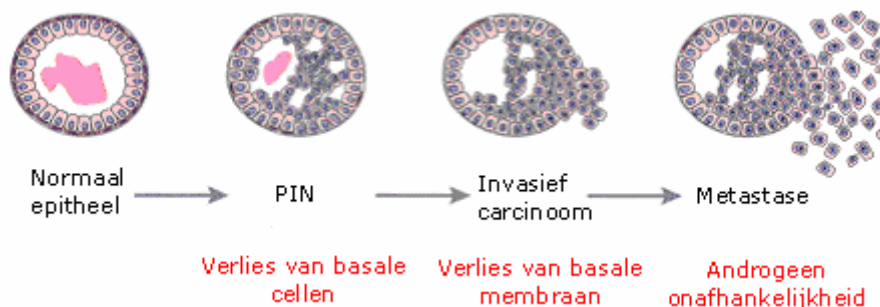
1.3 Prostaataandoeningen

Meerdere prostaataandoeningen kunnen aanleiding geven tot klachten waaronder plasklachten en/of pijn. Een eerste kan hierbij prostatitis zijn, hetgeen een ontsteking van de prostaat betekent.

Deze minder ernstige aandoening kan op iedere leeftijd worden aangetroffen en kan makkelijk worden genezen met behulp van antibiotica.

Benigne prostaat hyperplasie (BPH) veronderstelt een goedaardige vergroting van de prostaatklier die hoofdzakelijk zijn oorzaak vindt in hormonale veranderingen als gevolg van veroudering. Deze aandoening kan worden vastgesteld bij 80% van de mannelijke bevolking ouder dan 50 jaar en gaat niet steeds gepaard met klachten.

Prostaatcarcinomen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van prolifererende maligne cellen. Deze ernstige aandoening kan in een initiële fase makkelijk worden behandeld met behulp van prostatectomie of radiotherapie. Wanneer een vroegtijdige detectie echter niet plaatsvindt, kunnen agressievere tumoren ontstaan die gekarakteriseerd worden door lokale invasie van de zaadblaasjes en metastasering naar het bot- en/of lymfweefsel. Bovendien wordt deze transitie naar een metastatische ziekte meestal gevolgd door een overgang van androgeen afhankelijkheid naar androgeen onafhankelijkheid. Figuur 3 visualiseert de pathway voor de ontwikkeling van het prostaatcarcinoom in verschillende stadia.



Figuur 3: Pathway voor prostaatkanker progressie⁸

Vooraleer er sprake is van prostaatcarcinoom, vindt er een voorstadium plaats. 'Prostatic intraepithelial neoplasia' (PIN), hoofdzakelijk gekarakteriseerd door het verlies aan basale cellen, wordt verondersteld dit premaligne stadium te zijn. Deze aandoening zou zich 20 tot 30 jaar ontwikkelen voor het opduiken van het eigenlijke carcinoom. Ondanks momenteel een onderverdeling wordt gemaakt in low en high grade PIN, wordt een verschil in genezing niet gewaarborgd omwille van het gebrek aan een specifieke therapie voor deze aandoening. Een behandeling blijkt echter toekomstgericht zeer interessant aangezien dit de ontwikkeling van prostaatcarcinomen kan tegengaan. Experimenteel onderzoek met finasteride, anti-androgenen en beiden gecombineerd, wordt op dit ogenblik uitgevoerd.

Wanneer na verloop van tijd een transitie plaatsvindt met een verlies van het basale membraan, wordt gesproken van een invasief carcinoom. Macroscopisch vertonen deze tumoren een gelige, vastere samenstelling. Tevens worden deze carcinomen voornamelijk perifeer gesitueerd en worden ze multifocaal aangetroffen in de prostaat en/of de zaadblaasjes. Met behulp van microscopisch onderzoek, waarmee de aanwezigheid van een adenocarcinoom wordt bevestigd, wordt vooral de architectuur van de prostaat bestudeerd. Hierbij blijken de acinaire ruimtelijke schikking, vorm en diameter belangrijke parameters in het aanduiden van een carcinoom.

In het laatste stadium waartoe prostaattumoren zich kunnen ontwikkelen, worden metastasen waargenomen, dewelke zich kunnen verspreiden naar zowel het bot- als het lymfweefsel. Verder wordt dit stadium geassocieerd met een overgang naar een androgeen onafhankelijke tumor toestand.

Figuur A, weergegeven in bijlage 1, toont een MCM7-immunohistochemische kleuring van benigne prostaatweefsel, PIN en prostaatcarcinoom weefsel. MCM7, een minichromosome maintenance proteïne essentieel voor DNA replicatie, blijkt een efficiënte proliferatiemarker te zijn. Tevens staat deze marker toe een beter onderscheid te maken tussen deze drie weefselvormen dan de klassieke proliferatiemarker Ki-67.

Wanneer een prostaattumor wordt vastgesteld, wordt hiervan een stagiëring uitgevoerd. De algemeen aanvaarde methodiek hiervoor is de TNM-classificatie die toelaat prostaatcarcinomen in te delen. Eenvoudigweg kunnen prostaatcarcinomen in 4 types worden onderverdeeld (zie figuur B bijlage 2). Het T1 type omvat hierbij kleine tumoren, ontstaan en gelegen in de perifere zone. Tevens wordt dit type als het minst ernstige carcinoom beschouwd. T2 carcinomen zijn die tumoren die een uitstulping laten aanvoelen bij een rectaal onderzoek. Bij T3- en T4 -tumoren is er beiden sprake van een aangetast prostaatkapsel. Deze laatsten vertonen hiernaast echter nog andere aangetaste structuren zoals de zaadblaasjes.

Met behulp van de gleason-classificatie, kunnen prostaatcarcinomen histologisch worden getypeerd. Hierbij wordt aangenomen dat hoe hoger de gecombineerde gleasongraden (= gleasonscore), des te lager kans op genezing bestaat en des te slechter de prognose is. Tumoren kunnen door middel van deze classificatie 5 verschillende gleasongraden worden toegekend welke overeenstemmen met hun ernst (zie tabel A bijlage 3). Zuivere gleasongraden worden echter niet gebruikt, aangezien meestal twee graden tegelijk voorkomen in een prostaatcarcinoom. Om deze reden wordt veeleer geopteerd een gecombineerde gleasonscore toe te kennen aan één bepaalde tumor.⁸⁻¹¹

1.4 Risicofactoren

Dankzij het geleverde wetenschappelijk onderzoek gedurende de laatste decennia bestaat er momenteel een bredere kennis omtrent het ziekteproces. Er werden potentiële risicofactoren ontdekt die een significante bijdrage blijken te leveren aan de initiatie en progressie van het prostaatcarcinoom.

Leeftijd vormt dé voornaamste risicofactor. Reeds bij een leeftijd van 20 jaar, worden bij ongeveer 10% van de mannelijke bevolking prostaatkankercellen aangetroffen, doch klinisch detecteerbare prostaatkanker ontwikkelt zich doorgaans niet voor de leeftijd van 60 of 70 jaar. Tevens wordt een percentuele stijging tot 20 en 40% waargenomen bij respectievelijk een leeftijd van ongeveer 65 en 75 jaar. Morfologische veranderingen, geassocieerd met de initiatie van prostaatcarcinoom, zijn veel voorkomend en manifesteren zich in een vroeger stadium van het leven. Dit in tegenstelling tot de minder voorkomende histologische progressie naar een invasief carcinoom, wat geassocieerd is aan een toenemende ouderdom.

Een volgend risico omvat omgevingsfactoren zoals voedingsgewoonten, waaruit voortvloeit dat de etniciteit ook een impact heeft op de incidentie van prostaatkanker. Uit onderzoek werd namelijk

geconstateerd dat vooral Afrikaans-Amerikaanse mannen tot de hoog risico groep behoren. Het laagste risico werd waargenomen in Azië. Een hogere inname van dierlijke vetten in de Westerse wereld wordt in dit kader beschouwd als een belangrijke risicofactor voor de ontwikkeling van prostaatkanker. Verder kon worden vastgesteld dat obesitas, hetgeen steeds meer aangetroffen wordt in Westerse landen, de diagnose van de ziekte vertraagt. Dit leidt uitermate tot slechtere klinische vooruitzichten. Het Aziatische voedingspatroon dat rijkelijk soja, zeewier, rijst, shitake champignons, vis en groene thee bevat, blijkt daarentegen protectieve effecten te bieden tegen deze maligniteit. Andere protectieve factoren in het dieet die het ontwikkelen van prostaatcarcinoom tegengaan, omvatten tomaten en derivaten hiervan, broccoli en vitamine D. Alsook zou een hoog selenium gehalte in het lichaam dankzij zijn antioxidante capaciteiten een risicoverlaging kunnen betekenen. In figuur C, weergegeven in bijlage 4, kan een lineaire correlatie worden waargenomen wanneer de mortaliteit als gevolg van prostaatkanker en aangepast voor de leeftijd, uitgezet wordt ten opzichte van de gemiddelde vetinname via de voeding.

Naast deze omgevingsfactoren spelen ook genetische factoren een primaire rol voor het regionale en etnische verschil in prostaatkanker incidentie. Data doen veronderstellen dat de etnische variatie in prostaatkanker gedeeltelijk verklaard kan worden door genetische verschillen in androgeen secretie en metabolisme. Het voornaamste nucleaire androgeen in de prostaat is het dihydrotestosteron, wat vanuit testosteron gevormd wordt door het enzym 5- α -reductase. Polymorfismen in het SRD5A2 gen, dat codeert voor dit 5- α -reductase, zouden hierbij de oorzaak zijn van een verschil in enzymactiviteit en zouden geassocieerd zijn aan een verhoogde predispositie voor prostaatkanker.^{1-4, 8}

1.5 Diagnose en stagiëring

De oorzaak van optredende klachten, die kunnen duiden op de ontwikkeling van een prostaatcarcinoom, dient onderzocht te worden met behulp van verscheidene onderzoekstechnieken, opdat een efficiënte diagnose gesteld kan worden. Wanneer de aanwezigheid van een prostaatcarcinoom kan waargenomen worden, is het van groot belang te bepalen in welk stadium de tumor zich bevindt. Diagnose en stagiëring vormen immers belangrijke gegevens voor het bepalen van de meest efficiënte therapie en de prognose van de betreffende patiënt.

1.5.1 Symptomen

Prostaatcarcinoom is voornamelijk een traag groeiende tumor waarbij vaak geen symptomen optreden, zelfs niet wanneer de patiënt zich al in een gevorderd stadium van het ziekteproces bevindt. Eventueel optredende klachten kunnen zijn: een verminderde of onderbroken urinestroom, vaak en moeilijk urineren, pijn of branderig gevoel gedurende het plassen of de ejaculatie, bloed in de urine (hematurie) of sperma (hemaspermie). Deze symptomen wijzen echter niet specifiek op de aanwezigheid van een prostaattumor. Moeilijk plassen wordt immers vaker veroorzaakt door een BPH dan door een tumor.

1.5.2 Klinisch Onderzoek – PPA

Palpatio per anum (PPA) of Digital rectal examination (DRE) blijkt nog steeds de belangrijkste diagnostische methode om asymmetrie van de prostaatklier op te sporen. Bij het uitvoeren van deze onderzoekstechniek kan echter enkel het posterieure gedeelte van het orgaan worden gecontroleerd. Doch is dit rectaal toucher onmisbaar bij het vaststellen van prostaat afwijkingen, aangezien 70% van alle prostaattumoren zich in dit gebied ontwikkelen. Gedurende de uitvoering van de palpatie wordt voornamelijk de prostaatgrootte en -consistentie, pijn, aanwezigheid van nodi en het rectale slijmvlies nagegaan.

Ondanks het PPA onderzoek een lage positief predictieve waarde (~28%) heeft bij vroegtijdige prostaattumoren, blijkt de uitvoering ervan van zeer groot belang voor de mannelijke bevolking ouder dan 50 jaar.¹⁰⁻¹²

1.5.3 PSA-test

Vanaf 1988 kon een duidelijk toegenomen detectie van prostaatkanker waargenomen worden als gevolg van de ontwikkeling van een test voor het 'Prostaat Specifiek Antigen' (PSA). Doch, een afname in mortaliteit ten gevolge aan prostaatkanker, kon niet worden vastgesteld. Met de PSA-test wordt de aanwezigheid van het PSA-eiwit in het serum van patiënten gekwantificeerd met behulp van immunologische methodes.

PSA is een kallikrein-gelijklend serine protease dat origineel als het humaan kallikrein 3 (hK3) omschreven werd. Het protease wordt gesecreteerd door epitheliale prostaatcellen, gecodeerd door het androgeen-responsieve gen dat gelokaliseerd is op chromosoom 19q13.3-13.4 en wordt hoofdzakelijk verantwoordelijk gesteld voor het vergemakkelijken van de vrijzetting van spermacellen uit het semen coagulum. Verder kon worden vastgesteld dat dit protease ook gesecreteerd wordt, weliswaar in zeer kleine hoeveelheden, door andere normale mannelijke en vrouwelijke weefsels. Deze secreties blijken echter geen functionele significantie te vertonen.

Momenteel wordt wereldwijd een jaarlijkse PSA-test ten zeerste aanbevolen aan mannen ouder dan 50 jaar voor de screening naar prostaatacarcinoom. Verhoogde PSA-waarden (> 4,0 ng/ml) worden immers geassocieerd met een hogere prevalentie van deze aandoening. Hierbij zou deze test resulteren in de diagnose van geneeslijke tumoren op jongere leeftijd, hetgeen op zijn beurt zou leiden tot een verlaagd risico op mortaliteit ten gevolge van prostaatkanker. Bovendien zouden tumoren in een vroeger stadium gedetecteerd worden, met andere woorden meer gelokaliseerde en minder progressieve/gemetastaseerde prostaatacarcinomen worden gediagnosticeerd. Tevens zou de PSA-test een prognostische waarde hebben. Algemeen kan worden aangenomen dat hoe lager het PSA gehalte bij diagnose, des te lager de kans bestaat dat de ziekte zich zal manifesteren na behandeling. Indien het PSA gehalte hogere waardes vertoont, zou dit duiden op een minder goed behandelbare kanker.

Een belangrijke beperking van de PSA-test als efficiënte screening methode, is dat deze gekenmerkt wordt door een beperkte specificiteit en een lage positief predictieve waarde (~30%). Dit kan verklaard worden door het feit dat PSA niet kanker specifiek is en het PSA gehalte ook verhoogd kan voorkomen bij BPH, prostatitis en andere niet-maligne prostaataandoeningen. Het

gebrek aan specificiteit resulteert, samen met de hoge sensitiviteit (~70%) van de PSA-test, in een overdiagnose van de ziekte. Slechts 20 à 25 % van de mannelijke bevolking met een verhoogd PSA gehalte zou immers te kampen hebben met prostaatkanker. Verder hebben ongeveer 12 miljoen mannen prostaat kankercellen in hun lichaam. Desondanks zal slechts een kleine proportie hiervan sterven aan deze ziekte, aangezien vele van deze tumoren niet levensbedreigend blijken te zijn. Overdetectie van de ziekte doet dus meer slecht dan goed aangezien de overgrote meerderheid van mannen met prostaatkankercellen een andere doodsoorzaak zal kennen dan prostaatcarcinoom.

Een tweede beperking van de PSA-test is dat met deze test sommige prostaatcarcinomen gediagnosticeerd worden op een vroeger tijdstip in het ziekteproces, zonder dat hierbij het klinische eindpunt gewijzigd wordt. Een verklaring hiervoor kan zijn dat agressieve kankers al in een zeer vroeg stadium van het ziekteproces micrometastasen kunnen ontwikkelen, zelfs vooraleer resultaten van de test een abnormale waarde zouden vertonen.

Verder kunnen algemeen twee kankersoorten onderscheiden worden waarbij een eerste soort traag groeiende tumoren omvat, de ander soort diegenen met een snelle groei en verspreiding. Een hieruit volgend nadeel van PSA screening van de mannelijke bevolking bestaat erin dat veeleer traag groeiende tumoren worden gedetecteerd aangezien patiënten met een progressief carcinoom symptomen vertonen en op basis daarvan gediagnosticeerd worden. Hiernaast blijkt PSA ook geen ideale marker voor agressieve kankers. Dit omwille van de reden dat, wanneer het PSA gehalte wordt gecorrigeerd voor kankervolume, deze agressieve vormen minder PSA produceren.^{1-4, 6, 12}

1.5.4 Echo –TRUS

Wanneer er sprake is van een mogelijk carcinoom op basis van klinisch onderzoek en PSA-test, dient een transrectale ultrasonografie (TRUS) of echografie uitgevoerd te worden. Gedurende deze techniek wordt er gebruik gemaakt van geluidsgolven zodat op deze manier een optimale visualisatie van de prostaat kan plaatsvinden. De ontwikkeling van deze techniek heeft uitermate geleid tot de toenemende ontdekking van gelokaliseerde prostaattumoren, waarvan vervolgens het stadium kan worden bepaald. Tevens wordt hierdoor het voordeel opgeleverd van een betere lokalisatie van de prostaat en volumebepaling van tumoren. Verder wordt, in tegenstelling tot een PPA onderzoek, door TRUS een document verkregen dat het herzien van de resultaten toestaat.

PPA, PSA-test en TRUS worden momenteel als standaard onderzoekstechnieken beschouwd in de diagnostiek van prostaatcarcinomen, aangezien de complementaire uitvoering van deze drie methoden een positieve predictieve waarde oplevert van 80%.

1.5.5 Biopsie – TURP

Na het uitvoeren van de TRUS, kan een gerichte transrectale biopsie of transurethrale prostaatresectie (TURP) plaatsvinden. Hierbij wordt er met behulp van een naald via het rectum een stukje weefsel van de prostaat verkregen onder plaatselijke verdoving. Dit weefselbiopt zal vervolgens histologisch worden onderzocht op maligniteiten, hetgeen van groot belang is voor het

bepalen van de beste therapie. Alsook heeft de histologische diagnose geleid tot een hogere ontdekkingsgraad van gelokaliseerde prostaattumoren.

1.5.6 CT-scan, botscan en MRI

Nadat de aanwezigheid van prostaatcarcinoom werd bevestigd, wordt het stadium van het ziekteproces nagegaan. Dit bepaald immers mee welke behandelingsmethode het meest geschikt zou zijn. Hiervoor kan onder andere een CT-scan worden afgenomen, hetgeen zeer gedetailleerde röntgenfoto's van de buik of het bekken oplevert. Verder kan een andere techniek, namelijk een botscan of isotopenscan, metastasen naar het botweefsel detecteren. Alvorens dit onderzoek wordt uitgevoerd, wordt de patiënt een inspuiting met een zwak radioactieve stof (isotoop) toegediend. Met behulp van een recentere onderzoeksmethode, namelijk MRI (Magnetic Resonance Imaging), kunnen beelden van het inwendige lichaam aan de hand van een sterke magneet worden gegenereerd.

Algemeen kan worden gesteld dat deze onderzoekstechnieken geen efficiënte bijdrage leveren aan de diagnostiek van lokale tumoren. Doch zijn ze nuttig bij het opsporen van mogelijke metastasen.

1.6 Behandeling

Prostaatkanker is momenteel de meest voorkomende gediagnosticeerde maligniteit en de tweede voornaamste doodsoorzaak in de Westerse mannelijke bevolking. Wanneer een prostaattumor wordt vastgesteld, wordt een behandelingsmethode uitgekozen rekening houdend met de uitgebreidheid van de tumor, de algemene conditie en de leeftijd van de patiënt. Carcinomen die zich uitsluitend ontwikkelen in het orgaan zelf, worden hierbij eerder curatief behandeld met behulp van radicale prostatectomie of radiotherapie. Wanneer echter lokale of distantieële metastasen optreden, wordt een hormonale (anti-androgeen) behandeling toegepast als standaard therapie.

Bij uitvoering van een radicale prostatectomie wordt de prostaat volledig chirurgisch verwijderd. Deze effectieve, maar technisch delicate behandeling wordt enkel doorgevoerd bij lokale prostaattumoren. Mogelijke complicaties zijn hierbij impotentie en urineverlies (incontinentie).

Tevens kunnen lokale tumoren bestreden worden door middel van radiotherapie. Deze behandelingsmethode maakt gebruik van ioniserende stralen om prostaattumorcellen te vernietigen. Gedurende de therapie wordt radioactieve energie in de vorm van een stralenbundel gericht op de plek waar de tumor zich bevindt. Wanneer er sprake is van een gemetasteerde vorm, kan deze therapie enkel zorgen voor minimalisering van het gezwel en/of vermindering van optredende klachten. Bij prostaattumoren kan verder zowel een uitwendige als inwendige radiotherapie worden toegepast. Uitwendige bestraling gebeurt hierbij door een machine die straling uitzendt buiten het lichaam, hetgeen deze methode effectief en afdoende maakt. Toch kunnen complicaties optreden aangezien bestraling van de prostaat in dit geval ook gezonde cellen treft. Blaasklachten tijdens en na de behandeling, aanwezigheid van mucus in de faeces, pijn gedurende de ontlasting en vermoeidheid konden eerder al worden vastgesteld. Verder bleek impotentie te kunnen optreden enkele jaren nadat de therapie werd uitgevoerd. Inwendige bestraling of brachytherapie, wordt enkel doorgevoerd wanneer er sprake is van kleine tumoren in

een vroeg stadium waarbij de prostaat zelf nog geen vergroting vertoont. Gedurende deze bestralingstherapie wordt er radioactief materiaal rechtstreeks aangebracht in de prostaat. Op deze manier wordt er plaatselijk een hoge dosis straling uitgezonden, hetgeen deze methode veel ingrijpender maakt dan de uitwendige behandeling. Als gevolg vindt deze therapie plaats onder verdoving. Complicaties die met een inwendige bestraling samengaan, zijn onder andere plasklachten. Dit wordt veroorzaakt door zwelling en ontsteking van de urethra als gevolg van de hoge bestralingsdosis. Potentiële toornissen kunnen eveneens ontstaan enige tijd na de behandeling. Zoals eerder werd vermeld, wordt een hormonale therapie toegepast bij patiënten met gemetastaseerde prostaattumoren. De behandeling bestaat hedendaags uit het toedienen van geneesmiddelen via inspuiting of pillen, welke de werking van het mannelijke hormoon testosteron trachten te verminderen of te blokkeren. Op deze manier kunnen prostaattumoren worden verkleind of kan hun groei worden beperkt. Doch is er geen sprake van volledige genezing. Neveneffecten die kunnen optreden blijken afhankelijk van het soort hormoontherapie, maar algemene complicaties kunnen zijn: daling van het libido, impotentie, vermoeidheid, plotse warmteopwellingen, minimale gewichtstoename, opzwellen van de borsten en pijnlijke tepels. Ondanks meerdere behandelingsmethoden kunnen aangeboden worden, wordt er soms geopteerd voor een actieve opvolging. Hierbij wordt er afgewacht zodat de kankerevolutie accuraat kan worden opgevolgd. Deze optie kan plaatsvinden wanneer het gaat om minder agressieve tumoren, vooral bij een mannelijke bevolking ouder dan 70 jaar en met eventueel een andere gezondheidsproblematiek. Tevens kan voor deze methode worden gekozen wanneer de voordelen van een curatieve of hormonale therapie niet opwegen tegen de eventueel optredende bijwerkingen ervan.

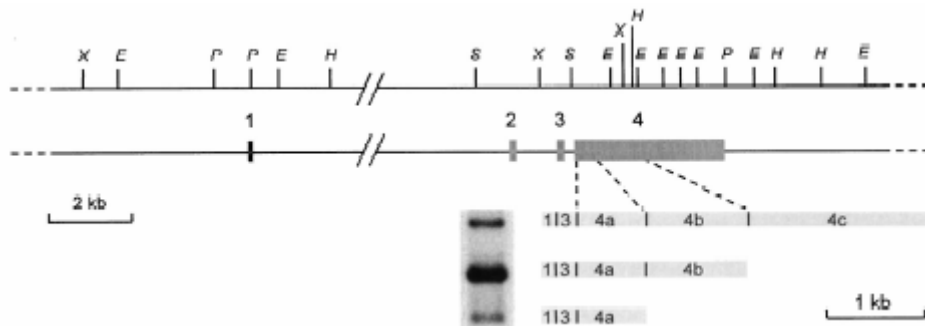
Aangezien er hedendaags nog geen sprake is van een efficiënte behandelingsmethode voor patiënten met progressieve prostaatkanker, stijgt de noodzaak voor de ontwikkeling van methodes die de mogelijkheid bieden prostaatcarcinoom in een vroeg stadium te detecteren. Daar de kans op genezing hierdoor verbeterd wordt, kunnen patiënten met een progressief prostaatcarcinoom hogere overlevingskansen geboden worden.¹⁰⁻¹¹

1.7 Nieuwe biomarkers voor prostaatcarcinoom

Beperkingen van de klassieke PSA-test hebben geleid tot het ontstaan van de toenemende twijfel dat het PSA gen een efficiënte marker is voor de diagnose en screening van prostaatcarcinoom in de mannelijke bevolking. Micro-array analyse onderzoek heeft de laatste jaren gezorgd voor een toename in het aantal potentiële genen welke specifiek tot expressie komen bij prostaatkanker en welke uiteindelijk een meerwaarde zouden kunnen hebben in de vroegtijdige opsporing van deze aandoening (zie tabel B bijlage 5). Wanneer van deze genen naast een hoge sensitiviteit ook een hoge specificiteit voor prostaatkanker kan worden aangetoond, kunnen deze nieuwe biomarkers als efficiënt, niet-invasief screeningtool toegepast worden bij de vroegtijdige detectie van prostaattumoren. Hierdoor zou onnodige biopsie afname van een vermoedelijk prostaatcarcinoom vermeden kunnen worden.¹⁻⁴

1.7.1 DD3/PCA3

Van het DD3/PCA3 gen werd aangetoond dat het specifiek tot expressie komt in prostaatkanker. De naam van het DD3 gen, een verwijzing naar de manier waarop deze marker werd opgespoord, namelijk met de differential display techniek, werd ondertussen vervangen door 'Prostate Cancer Antigen 3' (PCA3), wat de associatie met prostaatkanker verduidelijkt. PCA3 blijkt tot vandaag één van de meest specifieke markers voor het prostaatscarcinoom. Dit stemt overeen met de bevindingen, verkregen door middel van 'Reverse transcription polymerase chain reaction' (RT-PCR), dat een overmaat aan mRNA van dit genproduct aangetoond kan worden in prostaattumoren en dat een zeer lage tot afwezige expressie bestaat in normaal prostaatweefsel, BPH weefsel en eender welk ander humaan weefsel. Dit maakt PCA3 een veelbelovende marker die een belangrijke waarde zou kunnen hebben voor de vroegtijdige diagnose en therapie van prostaatscarcinoom. Klonaal onderzoek van de PCA3 transcriptie eenheid heeft verder uitgewezen dat het gen initieel 4 exonen bevat (zie figuur 4).



Figuur 4: Structuur van de PCA3 transcriptie eenheid¹⁵

Als gevolg van alternatieve splicing van het tweede exon en alternatieve polyadenylatie op de drie verschillende posities in exon 4, ontstaan transcripten van verschillende grootte waarvan het meest frequent voorkomende ($\pm 60\%$) exon 1, 3, 4a en 4b bevat. Aansluitend werd door analyse van het 'open reading frame' (ORF) bevestigd dat deze exonen een ongewoon grote hoeveelheid stopcodons bevatten. De overvloedige aanwezigheid van deze stopcodons en het ontbreken van een uitgestrekt ORF, hebben geleid tot het vermoeden dat PCA3 enkel een noncoderend mRNA tot expressie brengt. Ondanks een duidelijk detecteerbare overexpressie van dit mRNA, wordt geen cytoplasmatisch proteïne, resulterend van het PCA3 transcript, aangetroffen. Bovendien wordt normalerwijze het mRNA getransporteerd vanuit de nucleus naar het cytoplasma. Dit is echter in tegenstelling met de bevindingen dat het grootst aantal PCA3 transcripten zich situeert in de nucleus. Hun functie in dit celcompartiment blijkt tot op heden ongekend, maar een rol in de regulatie van genexpressie of participatie in het splicingproces van andere genen wordt gesuggereerd. Alsook wordt de mogelijkheid overwogen dat een gedeelte van de toegenomen transcriptconcentratie het resultaat kan zijn van een foutieve processing in plaats van een stijging in transcriptie. Verder is ook nog gebleken dat het PCA3 gen zeer stabiel is binnen één bepaalde soort, maar dat een enorme verscheidenheid optreedt tussen soorten onderling.

Zoals reeds eerder werd vermeld, wordt PCA3 gekenmerkt door een prostaat-specifieke expressie en een prostaatkankerspecifieke upregulatie, hetgeen een unieke transcriptionele regulatie van dit gen doet vermoeden. Karakterisering van de PCA3 promotor heeft ertoe geleid dat deze promotor een authentieke prostaatkankerspecifieke promotor is. Tevens werd met behulp van nucleotide sequentie analyse aangetoond dat deze promotor zowel TATA-boxen als initiator motieven ontbreekt en dat deze niet rijk is aan GC-fragmenten. Verder hebben meerdere experimenten, waarbij specifieke promotorregio's gemuteerd werden, aangetoond dat de PCA3 promotor 3 relevante 'footprints' (FP) bevat. Dit zijn deoxyribonuclease-I-beschermde regio's die de binding van transcriptiefactoren aan promotorelementen bewerkstelligt. FP3 lijkt hierbij te bezitten over een repressieve functionaliteit. Daar van FP2 kon worden aangetoond dat deze AT-rijk is, heeft dit de mogelijkheid opgewekt dat deze FP het target bij voorkeur is van de topologische transcriptiefactor 'high-mobility group proteïn-I(Y) (HMGI-Y). Deze factor is een klein, nonhiston nucleair proteïn waarvan geweten is dat het tot overexpressie wordt gebracht in prostaatcarcinomen en dat zijn expressie positief gecorreleerd is met de progressie van prostaatkanker. Hieruit volgt dat de promotor van het PCA3 gen interesse opwekt voor zijn applicatie in promotorgebaseerde genterapie bij patiënten met prostaatcarcinomen. Op deze manier kunnen immers therapeutische middelen selectief aan prostaatkankercellen geleverd worden.^{1,13-18}

1.7.2 AMACR

Een andere potentiële marker voor prostaatcarcinoom is α -methylacyl-CoA racemase (AMACR). Dit is een goed gekarakteriseerd enzym dat een belangrijke rol kent in de β -oxidatie van vertakte vetzuren en C27 galzuren. Hierbij convergeert het vertakte vetzuurketens van de R- tot hun S-stereoisomeer, welke kan dienen als substraat voor enzymen van de peroxisomale β -oxidatie. 2 aspecten van deze pathway kunnen hierbij een belangrijke relevantie betekenen in prostaatcarcinogenese. Een eerste aspect omvat dat de voornaamste bronnen van vertakte vetzuurketens bij mensen (melk, rood vlees en zuivelproducten) een belangrijke risicofactor vormen voor de ontwikkeling van prostaatcarcinoom. Het tweede aspect duidt op het feit dat de β -oxidatie aanleiding geeft tot de generatie van waterstofperoxide, hetgeen procarcinogene oxidatieve schade kan aanrichten.¹⁹⁻²¹

Recent werd met behulp van meerdere high-throughput micro-array screening studies, waarin AMACR expressie tussen benigne en maligne prostaatweefsel werd vergeleken, ontdekt dat dit enzym een duidelijke en consistente overexpressie kent in de epitheliale cellen van prostaattumoren.²⁰⁻²⁴ Tevens wordt AMACR overexpressie geassocieerd aan een verhoogd risico op prostaatcarcinoom, omwille van de vaststelling dat deze ook kan worden aangetroffen in premaligne lesies.^{21,23-24} Verder suggereren genome-wide scans voor linkage in families met een erfelijke prostaatkankervorm, dat de chromosomale regio van het AMACR gen, namelijk 5p13, de locatie is van een gen met een hoge gevoeligheid voor prostaatkanker en dat polymorfismen van het AMACR gen samengaan met een verscheidenheid aan prostaatkankervormen in families waar er sprake is van erfelijk prostaatcarcinoom.²⁰⁻²¹

Aangezien AMACR een specifieke mRNA overexpressie kent in prostaatkarcinoom epitheelweefsel en deze tumormarker efficiënt een biologisch relevante ziekte zou kunnen aantonen, kan deze recent ontdekte veelbelovende moleculaire kandidaat-marker toegepast worden in de vroegtijdige diagnose van prostaatkanker. Recent werd zelfs aangetoond dat AMACR detecteerbaar was in urine en bloed van mannen met een prostaatkarcinoom.²¹ Een RT-PCR AMACR-test zou dus ook de mogelijkheid kunnen bieden om op een niet-invasieve manier de aanwezigheid van prostaatkarcinoom aan te tonen in prostaatsecreties.²⁵⁻²⁶

1.8 Doelstelling

In dit werk werd een gevoelige moleculair genetische test ontwikkeld voor de detectie en kwantificatie van PCA3 en AMACR RNA. Er werd gebruik gemaakt van RNA-extractie, reverse transcriptie (RT) en real-time RT-PCR met TaqMan methodologie. Verkregen resultaten werden uiteindelijk genormaliseerd ten opzichte van het huishoudgen 'Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase' (GAPDH) en het PSA-gen, zodat de relatieve expressie van PCA3 en AMACR berekend kan worden. Elk van de vier resulterende testen (PCA3/GAPDH, PCA3/PSA, AMACR/GAPDH, AMACR/PSA) werd gevalideerd voor bruikbaarheid op zowel prostaatweefselbiopten als op urinestalen bekomen na prostaatmassage. Hiervoor werd in eerste instantie de specifieke overexpressie van PCA3 en AMACR in prostaatkarcinoomcellen versus benigne prostaatcellen onderzocht. Het uiteindelijke doel was om na te gaan wat de performantie van deze testen is in de differentiële diagnose van maligne versus benigne prostaataandoeningen en dit zowel op prostaatmassage vocht als op prostaatweefselbiopten.

2. Materialen en Methodes

2.1 Stalen

In totaal 66 prostaatweefsel biopsies, verkregen na TURP of totale prostatectomie, werden vriendelijk aangeboden door de pathologe Dr. Achten van het Virga Jesse Ziekenhuis. 20 weefselstalen waren hiervan histologisch getypeerd met een invasief prostaatcarcinoom (maligne), 30 met een benigne prostaataandoening (BPH of prostatitis). Daarnaast waren tevens 14 weefselstalen beschikbaar, afkomstig van het benigne deel van een carcinoom bevattende prostaat en histologisch negatief voor carcinoom.

Vijfendertig urinestalen, verkregen na prostaatmassage, werden bekomen door de vriendelijke medewerking van de uroloog Dr. Vekemans. De urinestalen werden geklasseerd als benigne (n= 29) of maligne (n= 6) op basis van de histologische beoordeling van een TURP-biopt (indien uitgevoerd), of op basis van de gecombineerde resultaten van klinisch onderzoek, PSA-test en TRUS. Toestemming tot gebruik van de stalen werd door patiënten vooraf verleend door middel van een informed consent. Daarnaast werden ook 4 perifeer bloedstalen alsook 8 urines van gezonde vrouwen geanalyseerd als controlestalen.

2.2 RNA stabilisatie in urinesedimenten

Gecollecteerde urinestalen werden vooreerst verdeeld over 15ml steriele proefbuisje waarna deze werden gecentrifugeerd gedurende 30 minuten bij 2000 x g op 25°C. Vervolgens werd de procedure verdergezet met verkregen urine celpellets dewelke na resuspensie in 1ml PBS (Phosphate Buffered Saline) overgebracht werden in 1,8ml cryobuisjes (NUNC). Deze werden op hun beurt gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 16000 x g op 25°C. Na verwijdering van het bekomen supernatans, werd 150µl RNA_{later} toegediend aan ieder buisje en vond centrifugatie plaats op 25°C gedurende 40 seconden bij 16000 x g. Tenslotte werden de cryobuisjes ingevroren op -196°C met behulp van vloeibare stikstof (snap freezing), waarna ze uiteindelijk werden bewaard op -80°C.

2.3 RNA extractie en cDNA synthese

Totaal RNA van vers ingevroren weefselcoupes, werd geïsoleerd en gezuiverd met behulp van de RNeasy plus mini kit (Qiagen). Vervolgens werd het bekomen eluent (30µl) gekwantificeerd en gecontroleerd op zuiverheid door middel van spectrofotometrie (NanoDrop[®]ND-1000 Spectrophotometer, Isogen Life Science). Stalen werden hierbij als zuiver beschouwd wanneer een ratio A260/A280 werd waargenomen met een waarde gelegen tussen 1,8 en 2,0.

Bij aanvang van de cDNA synthese werden gezuiverde RNA stalen (8µl) aangevuld met MIX1 (zie tabel 1) tot een eindvolume van 10µl, dan gedenateerd gedurende 5 minuten bij 65°C. Vervolgens werden ze 1 minuut gekoeld op ijs waarna 10µl van MIX2 (zie tabel 2) werd toegevoegd aan ieder staal. Na aanhechting van nucleotides gedurende 10 minuten bij 25°C, vond extensie plaats gedurende 50 minuten bij 50°C. Vervolgens gebeurde inactivatie van het enzym

Superscript III bij 85°C voor 5 minuten, waarna de stalen werden behouden op 10°C. Tenslotte werd 1µl RNase H toegevoegd aan ieder staal opdat een hoge specificiteit van de RT-PCR verzekerd kon worden. Incubatie vond hierna 20 minuten plaats bij 37°C zodat de stalen uiteindelijk bewaard konden worden op -20°C tot aanvang van de RT-PCR analyse. cDNA synthese werd hierbij uitgevoerd met behulp van een Thermocycler PTC200 (Biorad).

Tabel 1: cDNA synthese MIX1

Reagentia	Volume (µl)
Random hexameren	1
dNTP mix (10mM)	1
Totaal	2

Tabel 2: cDNA synthese MIX2

Reagentia	Beginconcentratie	Mixconcentratie	Volume (µl)
RT-buffer	10x	1x	2
MgCl ₂	25mM	5mM	4
DTT	0,1M	10mM	2
RNase out	40 U/µl	40 U	1
Superscript III	200 U/µl	200 U	1
Totaal			10

RNA extractie uit cellen aanwezig in de urine stalen, werd uitgevoerd op RNA gestabiliseerde urinesedimenten volgens de richtlijnen beschreven in de Rnaesy micro kit (Qiagen). Alvorens de extractie plaatsvond, werden bewaarde sedimenten achtereenvolgens ontdooid, gecentrifugeerd gedurende 5 minuten op maximale snelheid (4165 x g), gewassen met 1ml PBS en weer gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 16000 x g. Wanneer echter roze sedimenten werden verkregen gedurende de stabilisatiestap, werd de extractie voorafgegaan door een andere procedure. Stalen werden hierbij, na ontdooiding, eerst gedurende 5 minuten gekoeld (4°C) gecentrifugeerd bij 4165 x g. Na verwijdering van het supernatans, gevolgd door toevoeging van 5 delen (~250µl) erythrocytlysisbuffer, werden de stalen 10 minuten geïncubeerd op ijs. Dan werden ze gekoeld gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 3000 rpm, waarna het supernatans weer werd afgenomen. Hierna werd 125µl erythrocytlysisbuffer toegevoegd aan ieder staal, hetgeen gevolgd werd door de voorgaande centrifugatiestap. Uiteindelijk werd, na verwijdering van het supernatans, 1ml PBS toegevoegd en werden de stalen 10 minuten gecentrifugeerd bij 16000 x g. Het eluent (14µl), bekomen na de extractie, werd nadien eveneens gekwantificeerd en gecontroleerd op zuiverheid en kwantiteit van het RNA met behulp van spectrofotometrie. Stalen werden hierbij eveneens als zuiver beschouwd wanneer de ratio A260/A280 een waarde aangaf gelegen tussen 1,8 en 2,0.

cDNA-synthese van het RNA, afkomstig van cellen aanwezig in urine, werd op een analoge manier uitgevoerd als bij het weefsel RNA.

2.4 Conventionele RT-PCR voor GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR

De conventionele RT-PCR voor GAPDH (Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase), PSA (Prostate Specific Antigen), PCA3 (Prostate Cancer Antigen 3) en AMACR (Alpha-Methylacyl-coenzym-A racemase) werd uitgevoerd met de Thermocycler PT200. Gedurende de RT-PCR reactie vond een exponentiële amplificatie plaats van het vooraf gesynthetiseerde cDNA, afkomstig van (non-) prostaatcarcinoom weefsel. Bij aanvang van deze reactie onderging het dubbelstrengig cDNA denaturatie bij 95°C gedurende 5 minuten. Dit werd gevolgd door 34 cycli bestaande uit denaturatie (95°C, 45s), annealing (50°C, 45s), en extensie (72°C, 1 min 30s). Verkregen amplicons werden uiteindelijk 10 minuten geplaatst bij 72°C waarna ze behouden werden op 10°C. Detectie van de bekomen PCR-producten gebeurde met behulp van gelelectroforese.

Het reactiemengsel van de conventionele RT-PCR-reactie wordt weergegeven in onderstaande tabel (tabel 3). De sequenties van de aangewende primers (900nM) worden verder weergegeven in tabel 6.

Tabel 3: Samenstelling van de conventionele RT-PCR-mix

Reagentia	Volume (µl)
Water	33,6
Taq-polymerase	0,2
dNTP	3
Primer Forward (9mM)	1,1
Primer Reverse (9mM)	1,1
Buffer	5
MgCl ₂	4
cDNA	2
Totaal	50

2.5 Sequentiebepaling van GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR

Vooraleer een geoptimaliseerde RT-PCR voor elk van de 4 genen werd ontwikkeld, werden de genproducten, bekomen met conventionele RT-PCR, gesequenced voor controle van de primer specificiteit.

2.5.1 Opzuivering van de RT-PCR producten

Vooreerst de sequentiebepaling werd uitgevoerd, werd het cDNA van alle 4 genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR opgezuiverd, zodat specificiteit van deze genen kon worden gewaarborgd. Opzuivering van GAPDH-, PSA- en AMACR-cDNA werd hierbij enzymatisch gedaan door middel van EXOSAP-IT. Bij de start van deze procedure werd 4µl van dit enzym toegevoegd aan 10µl staal. Vervolgens werd elk staal eerst 15 minuten geïncubeerd bij 37°C, dan 15 minuten op 80°C, hetgeen uiteindelijk zorgde voor inactivatie van het toegevoegde enzym.

Omdat gelelektroforese 2 bandjes vertoonde voor PCA3, werd van beide isovormen de sequentie nagegaan. Opzuivering van deze 2 gelbandjes gebeurde hierbij volgens de procedure weergegeven in de Qiaquick Gel Extraction Kit.

2.5.2 Sequencing reactie van de RT-PCR producten

Gedurende een volgende stap in het bepalen van de gensequenties, werden gelabelde dNTP's ingebouwd in het opgezuiverde materiaal. Deze stap werd hierbij uitgevoerd met behulp van een specifieke PCR-reactie voor de 4 genen, waarbij een forward of reverse primer werd meegenomen in het reactiemengsel. Om het opgaan van de reactie na te gaan, werd PUC (Puckered phosphatase) als controle gen meegenomen.

Gedurende de reactie werd ieder staal onderworpen aan 29 cycli bestaande uit denaturatie (96°C, 20s), annealing (50°C, 20s) en extensie (60°C, 4min). Hierna werden de stalen behouden op 10°C. Het benodigde staalmix en controlemix voor uitvoering van deze reactie wordt voorgesteld in respectievelijk tabel 3 en 4. Specifieke primers die hierin worden aangewend, staan weergegeven in tabel 5 (zie 2.6).

Tabel 4: Samenstelling van het staalmix

Reagentia	Volume (µl)
Opgezuiverd amplicon	4,0
Dnase/Rnase vrij water	7,4
Primer (9µM)	0,6
DTCS Quick start mastermix	8,0
Totaal	20,0

Tabel 5: Samenstelling van de controlemix

Reagentia	Volume (µl)
PUC 18	0,5
Dnase/Rnase vrij water	9,5
M13-47 seq primer	2,0
DTCS Quick start mastermix	8,0
Totaal	20,0

Gedurende de laatst uitgevoerde stap voor de sequentiebepaling werd een ethanolprecipitatie uitgevoerd. Bij aanvang van deze procedure werd aan ieder verkregen amplicon 5µl STOP-oplossing (2 volumes 0,1M EDTA, 2 volumes 3M Natriumacetaat en 1 volume glycogeen) toegevoegd waarna ze kort werden gevortext. Nadien werd 60µl 96% ethanol toegediend aan elk staal en werden ze, na korte opmenging, 10 minuten gecentrifugeerd bij 14 000 rpm op 4°C. Na verwijdering van het supernatans, werd vervolgens aan elk bekomen pellet 200µl 70% ethanol toegevoegd, hetgeen gevolgd werd door centrifugatie gedurende 2 minuten bij 14 000 rpm op 4°C. Dit werd tweemaal uitgevoerd. Nadien werd het verkregen supernatans verwijderd en werden verkregen pellets gedroogd aan de lucht zodat verdamping van resterend ethanol kon

plaatsvinden. Gedroogde pellets werden naderhand geresuspendeerd in 40µl SLS (Sample loading solution), overgebracht in een ladingsplaat en aangelengd met 1 druppel mineraal olie. Tevens werden wells van de Beckmann 96-well plaat voor $\frac{3}{4}$ volume gevuld met separation buffer. Hierbij werden evenveel kolommen gevuld als er in de ladingsplaat gebruikt waren. Beide platen werden uiteindelijk aangebracht in de capillaire gelelektroforese sequencer (CEQ 8000 genetic analysis system) zodat de sequentiebepaling van de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR kon plaatsvinden.

2.6 Real-time RT-PCR voor GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR

Om de aanwezigheid van de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR aan te tonen en te kwantificeren in prostaatweefsel, werden specifieke real-time RT-PCRs uitgevoerd met behulp van TaqMan methodologie en de Rotor-gene 3000 (Corbett). Gebruikte primers en probes, meegenomen in deze reactie, staan weergegeven in respectievelijk tabel 6 en 7. Primers en probes werden hierbij ontwikkeld met het software programma 'Primer3', beschikbaar op het internet. Verder zijn de probes gelabeld met een reporter-dye en een quencher-dye welke tijdens de elongatie door hydrolyse van de probe van elkaar gescheiden worden. Door het wegvallen van het onderdrukkend effect van de quencher op de reporter, zal de reporter zijn fluorescent signaal kunnen beginnen afgeven. Toename van dit fluorescent signaal is dan ook een maat voor de sterkte van de amplificatie. Hoe sneller dit fluorescentiesignaal boven een bepaalde threshold zal uitstijgen, hoe meer kopieën van het target gen aanwezig waren in de start-reactiemix. De Ct-waarde, dit is de cyclus waarbij het fluorescentiesignaal de threshold op de zogenaamde 'amplificatieplot' kruist, wordt dan ook gebruikt als de kwantitatieve parameter. De probes zijn tevens LNA-gemodificeerd (Locked Nucleic Acid) wat resulteert in een hogere specificiteit van de binding aan het target gen (aangeduid in de tabel met + hoofdletter). LNA-modificaties werden bepaald met het software programma 'OligoAnalyzer 3.0', beschikbaar op het internet.

Tabel 6: Aangewende primers voor de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR

Primer	Sequentie	Concentratie (nM)
GAPDH Forward	5'-GATCATCAGCAATGCCTCCT-3'	300
GADPH Reverse	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'	300
PSA Forward	5'- CCACTGCATCAGGAACAAAA-3'	50
PSA Reverse	5'-AGCTGTGGCTGACCTGAAAT-3'	50
PCA3 Forward	5'-AAGATCTGCATGGTGGGAAG-3'	300
PCA3 Reverse	5'-CATCGATGACCCAAGATGG-3'	300
AMACR Forward	5'-TTATGTGTGCACTGGGCATT-3'	900
AMACR Reverse	5'-GAGGTGCTTCCCACAGACTC-3'	900

Tabel 7: Aangewende probes voor de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR

Probe	Sequentie	Label	Concentratie (nM)
GAPDH	5'- L caa+Ctg+Ct+Tagca+Cc-3'	5' Cy5 ; 3' BHQ3	150
PSA	5'- L ct+Tg+Ctg+Ggt+Cgg-3'	5' Yakima Yellow ; 3' BHQ1	150
PCA3-DD3	5'- L g+Ca+Caaa+Ag+Ga+Tca+Ttga-3'	5' 6-FAM ; 3' BHQ1	50
AMACR	5'- L g+Gg+Tca+Gg+Tca+Ttga-3'	5' 6-FAM ; 3' BHQ1	50

Er werd steeds uitgegaan van een totaal reactievolume van 25µl en de vaste temperatuurcondities. De PCR-reactie werd gestart op 95°C gedurende 15 minuten, hetgeen denaturatie van het dubbelstrengige cDNA veroorzaakte. Nadien werd 50 maal een cyclus uitgevoerd waarbij eerst annealing van specifieke primers en probes plaatsvond gedurende 10 seconden bij 95°C. Tijdens de tweede stap gebeurde extensie bij 60°C voor 45 seconden. Kwantitatieve detectie van het amplicon werd als gevolg van het geproduceerde probe-specifiek fluorescentiesignaal tijdens de amplificatiefase met behulp van de Ct-waarden verkregen. De samenstelling van de toegepaste RT-PCR-mix staat weergegeven in onderstaande tabel (tabel 8).

Tabel 8: Samenstelling van de PCR-mix onder optimale condities

Reagentia	Volume (µl)
Water	2,5
Primer Forward	2,5
Primer Reverse	2,5
Probe	2,5
Mastermix (1x)	12,5
cDNA	2,5

De optimale primer en probe concentraties werden bepaald door middel van een optimalisatie matrix (cfr. resultaten). Verdunningsreeksen van patiëntstalen werden gemaakt en geanalyseerd voor het bepalen van gevoeligheid en efficiëntie van elk van de 4 RT-PCRs. Hierbij diende er aan 2 criteria voldaan te worden, namelijk de helling (m) moest een waarde hebben die gelegen was tussen -3,1 en -3,6 ($Ct = (\log \text{concentratie}_x \times m) + (y\text{-intercept})$) en de efficiëntie (E) in de exponentiële fase moest groter of gelijk zijn aan 90% ($E = 10^{-1/m} - 1 \geq 90\%$). E = 1 stemt hierbij overeen met een efficiëntie van 100%.

2.7 Genormaliseerde en comparatieve kwantificatie: PCA3/GAPDH-, PCA3/PSA-, AMACR/GAPDH-, AMACR/PSA-testen

Genexpressie van PCA3 en AMACR werden genormaliseerd ten opzichte van de expressie van het huishoudgen GAPDH en het prostaat specifieke PSA-gen, voor correctie van RNA-input en RT-stap. Hierbij is het belangrijk dat de efficiënties van de RT-PCRs voor de doelwitgenen (PCA3, AMACR) en de normalisatiegenen (GAPDH, PSA) vergelijkbaar zijn binnen het dynamisch meetbereik. Bij de comparatieve $\Delta\Delta\text{Ct}$ methode wordt de genormaliseerde genexpressie relatief berekend ten opzichte van een calibratorstaal door middel van onderstaande formule.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{doelwit gen}) - \text{Ct} (\text{normalisatie gen})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{calibrator}) - \Delta\text{Ct} (\text{staal})$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad R = \text{relatieve expressie}$$

2.8 Statistische analyse

Om de diagnostische waarde van PCA3 en AMACR, genormaliseerd ten opzichte van GAPDH en PSA, na te gaan bij screening van prostaatcarcinoom biopsies, werden de data statistisch geanalyseerd gebruik makend van Microsoft® Excel Analyse-it + General 1.71. De vier diagnostische testen (PCA3/GAPDH, PCA3/PSA, AMACR/GAPDH en AMACR/PSA) werden eerst comparatief voorgesteld met behulp van boxplots, waarbij gebruik gemaakt werd van de logaritmische genormaliseerde waarden van de afzonderlijke data. Statistische verschillen tussen de testen onderling werden aangetoond met behulp van de Mann-Whitney test. Resultaten met een p-waarde $\leq 0,05$ worden hierbij als significant beschouwd. De genormaliseerde waarden van alle vier diagnostische testen werden vervolgens geplot in een ROC-curve. Hiermee wordt geanalyseerd in hoeverre de relatieve RNA expressie van PCA3 en AMACR maligne en benigne prostaatweefsel kan onderscheiden. Na bepaling van de cut-off waarde, werd de sensitiviteit, specificiteit en positief- en negatief predictieve waarde van iedere test afzonderlijk bepaald. Alsook werd een waarde verkregen voor de AUC (Area under the curve).

Het statistisch analyseren van prostaatcarcinoom in prostaatmassage vocht werd op analoge wijze uitgevoerd als bij de prostaatbiopsies.

3. Resultaten

Bij aanvang van dit onderzoek werd een RT-PCR assay ontwikkeld en geoptimaliseerd voor de kwantificatie van PCA3- en AMACR-RNA in prostaatweefsel. Met behulp van deze test werd vervolgens het verschil in PCA3- en AMACR- expressie tussen benigne en maligne prostaatweefsel gecontroleerd, hetgeen gerealiseerd werd met restmateriaal afkomstig van diagnostische biopsies (TURP, prostatectomie). Tenslotte werd een klinische validatie van de test uitgevoerd voor de toepassing in de diagnostiek van prostaatacarcinoom zowel op prostaatweefsel als op prostaatmassage vocht, en werd een vergelijking uitgevoerd met de klassieke PSA-test.

3.1 Ontwikkeling en optimalisatie van de kwantitatieve RT-PCR voor GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR

Er wordt gebruik gemaakt van standaard temperatuurcondities en mix samenstellingen zoals beschreven in materialen en methoden. Voor bepaling van de optimale primer en probe concentraties wordt het cDNA, afkomstig van prostaatweefsel RNA, onderworpen aan een combinatoriële matrix bestaande uit verschillende primer- en probeconcentraties. Primer concentraties zijn hierbij 50, 300 of 900nM, mogelijke probe concentraties zijn 50, 100, 150 en 200 nM. Verder wordt de optimalisatie PCR voor de genen GAPDH en PSA uitgevoerd met behulp van cDNA afkomstig van 1/10 en 1/100 verdund geëxtraheerd RNA. Voor de genen PCA3 en AMACR wordt in de PCR reactie cDNA meegenomen, afkomstig van 1/100 en 1/1000 verdund RNA. Kwantitatieve detectie van het amplicon wordt verkregen als gevolg van het geproduceerde probe-specifiek fluorescentiesignaal tijdens de amplificatiefase, hetgeen geanalyseerd wordt door de software van de Rotor-gene 3000. Hoe lager de Ct-waarde, hoe sterker de amplificatie. Waarden van PCA3 en AMACR expressie worden genormaliseerd ten opzichte van GAPDH en PSA, voor correctie van de RNA-input en de RT-stap. De bekomen genormaliseerde resultaten worden uitgedrukt als comparatieve waarden ten opzichte van een bepaald, benigne calibratorstaal met waarde 1.

De optimale primer- en probeconcentraties, verkregen uit de optimalisatie matrix, zijn deze die resulteerden in de laagste Ct-waarde en staan weergegeven in tabel 9. Tevens staan in tabel 10 de bekomen RT-PCR specificaties weergegeven. Deze voldoen aan de vooropgestelde criteria (zie materialen en methoden 2.6).

Tabel 9: Optimale primer-probe condities van de kwantitatieve RT-PCR reacties

Reagentia	Optimale concentratie (nM)
GAPDH primer Forward	300
GAPDH primer Reverse	300
GAPDH probe	150
PSA primer Forward	50
PSA primer Reverse	50
PSA probe	150
PCA3 primer Forward	300
PCA3 primer Reverse	300
PCA3 probe	50
AMACR primer Forward	900
AMACR primer Reverse	900
AMACR probe	50

Tabel 10: Resultaten van de RT-PCR specificaties voor de genen GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR

Gen	Helling	Efficiëntie	Gevoeligheid
GAPDH	-3,476	0,94	1/10 ⁶
PSA	-3,572	0,91	1/10 ⁶
PCA3	-3,522	0,92	1/10 ⁴
AMACR	-3,098	1,1	1/10 ³

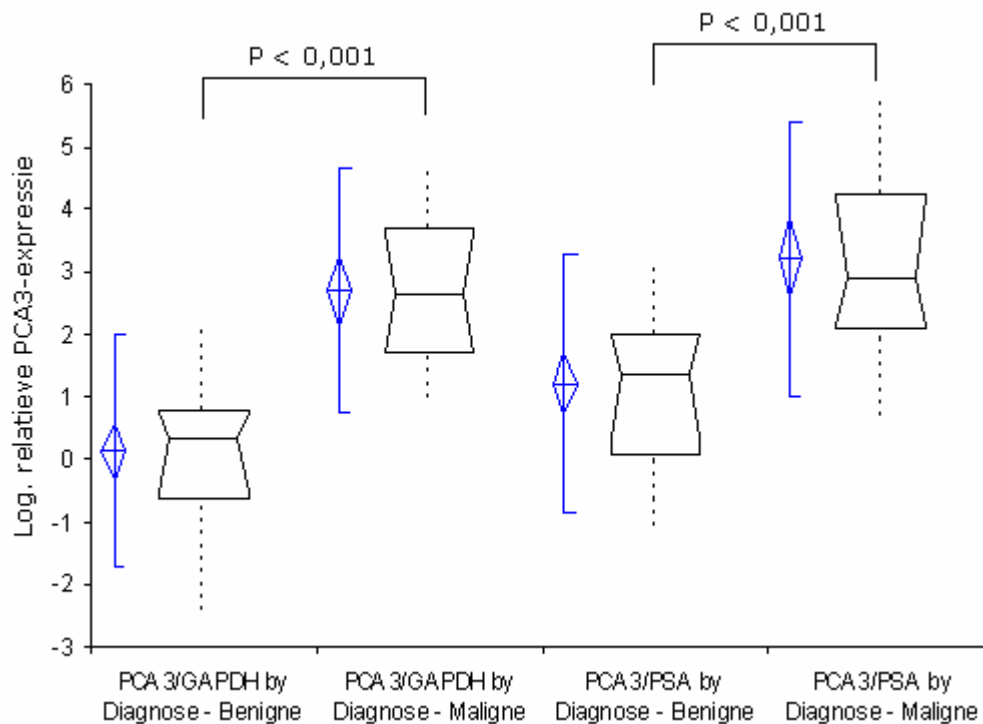
De primerspecificiteit van GAPDH, PSA, PCA3 en AMACR wordt gegarandeerd door de uitgevoerde sequentie-analyse. Hierbij werd een 100% homologie van de RT-PCR producten waargenomen met de gekende gensequenties zoals geregistreerd in Genbank (GAPDH: NM002046; PSA: NM001648; PCA3: AF103907; AMACR: NM014324).

Om de prostaat specificiteit van de genen na te gaan, werden de genexpressies van de 4 genen gecontroleerd in bloedstalen. Tevens werd dit uitgevoerd met behulp van urine, afkomstig van vrouwen. Hierdoor kan worden bevestigd dat PSA en PCA3 beiden een prostaat specifieke genexpressie hebben. Naast het huishoudgen GAPDH, kan ook het niet prostaat-specifiek AMACR-RNA zowel in bloed- als in urinestalen van vrouwen worden gedetecteerd.

3.2 Expressie van PCA3 en AMACR in benigne en maligne prostaatweefsel

Om het verschil in PCA3 en AMACR expressie tussen benigne en maligne prostaatweefsel te bevestigen, wordt het verschil in gemiddelde relatieve expressie van beide genen nagegaan. Dit wordt gedaan voor zowel het PCA3 als het AMACR gen, welke beiden worden genormaliseerd ten opzichte van GAPDH en PSA.

3.2.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test

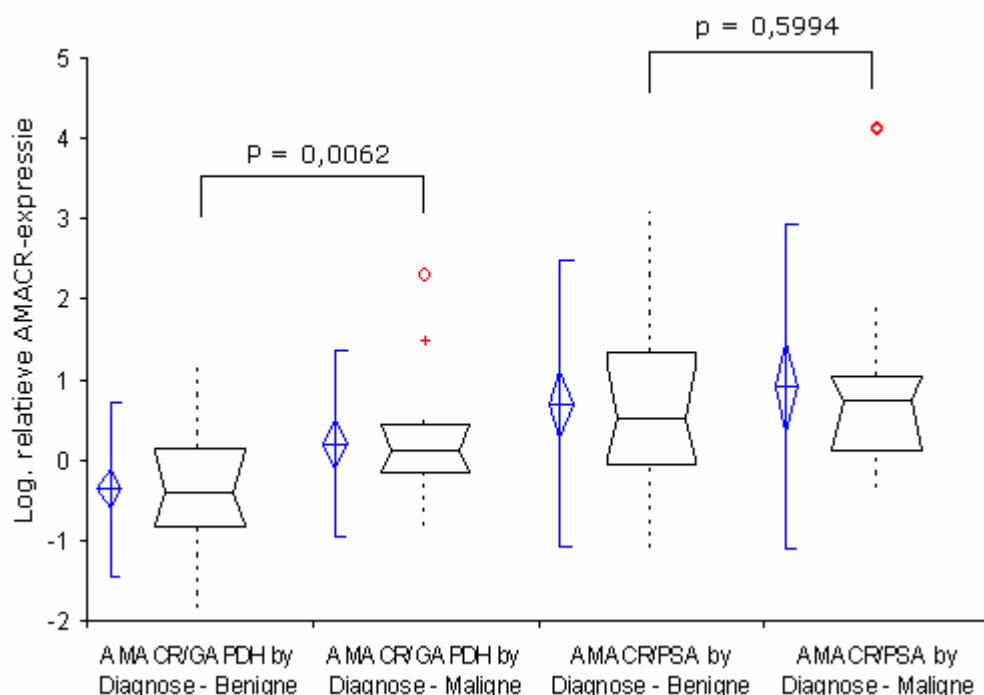


Figuur 5: Logaritmische relatieve PCA3-RNA expressie in benigne versus maligne prostaatweefsel. (n= 46; 28 benigne + 18 maligne)

De PCA3/GAPDH-test geeft een gemiddelde expressie waarde van 11,2 (range: 0,0-160,3) en 5587,5 (range: 9,2-51063,3) voor respectievelijk benigne en maligne prostaatweefsel. De maligne populatie heeft hierbij een gemiddelde PCA3-expressie die ~500 maal hoger is dan deze van de benigne populatie (p-waarde < 0,001). Van de PCA3/PSA-test wordt een gemiddelde PCA3-RNA expressie waargenomen van 163,3 (range: 0,0-1172,2) in benigne weefsel en 46645,3 (range: 4,8-713720,7) in maligne weefsel. Dit stemt dus overeen met een toegenomen genormaliseerde PCA3 expressie van ~286 in maligne prostaatweefsel, hetgeen beduidend lager is dan bij een normalisatie ten opzichte van het huishoudgen GAPDH. Doch, deze test toont ook statistisch significant het verschil in PCA3 en AMACR expressie weer tussen maligne en benigne weefsel (p-waarde < 0,001).

Deze bevindingen worden grafisch weergegeven in figuur 5. De relatieve PCA3 expressie waarden in de boxplots worden voorgesteld op een logaritmische schaal.

3.2.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test



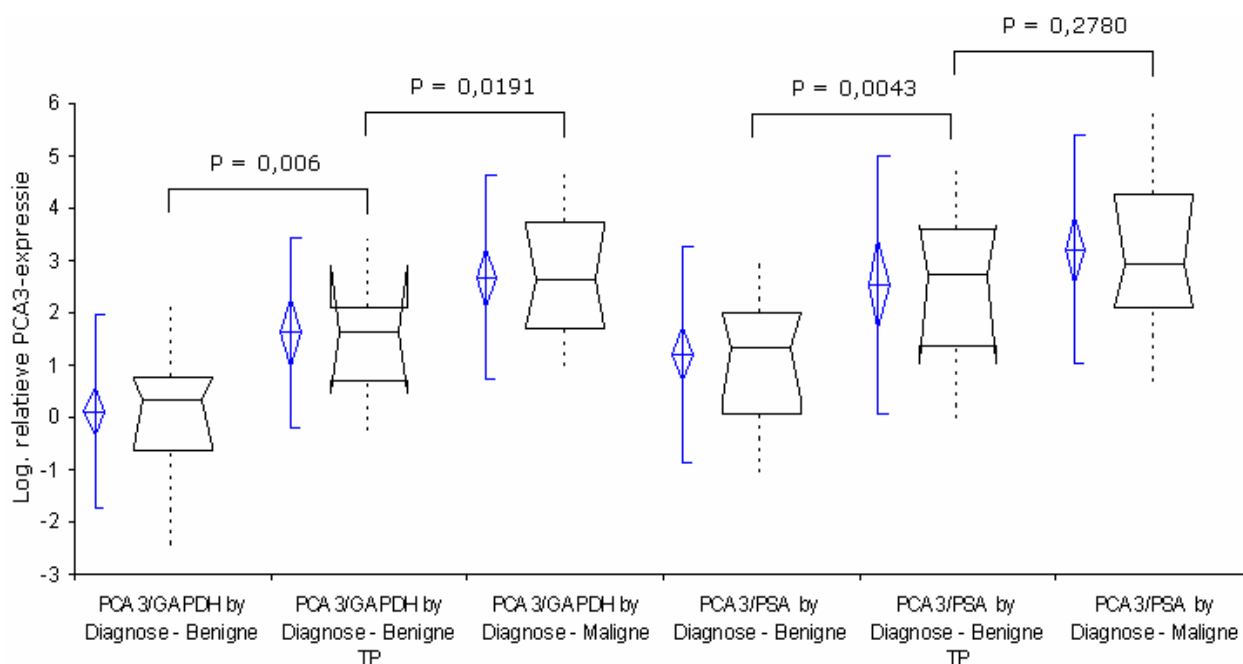
Figuur 6: Logaritmische relatieve AMACR-RNA expressie in benigne versus maligne prostaatweefsel. Normalisatie ten opzichte van GAPDH: n= 51 (30 benigne + 21 maligne); normalisatie ten opzichte van PSA: n= 49 (28 benigne + 21 maligne).

De gemiddelde RNA-expressie van AMACR met de AMACR/GAPDH-test bedraagt 1,3 (range: 0,0-15,2) in benigne en 12,7 (range: 0,2-194,7) in maligne prostaatweefsel. Dit stemt overeen met een statistisch significant toegenomen expressie met factor 9,9 in de maligne populatie ($p = 0,0062$). De AMACR/PSA-test geeft gemiddelde AMACR-expressies van 91,3 (range: 0,1-1230,5) en 661,6 (range: 0,5-13921,2) in respectievelijk de benigne en maligne populatie. Hieruit wordt gesteld dat het maligne weefsel een gemiddelde relatieve AMACR overexpressie vertoont met factor 7,2. Doch, de relatieve AMACR-expressie, genormaliseerd ten opzichte van PSA, blijkt niet significant te verschillen tussen benigne en maligne prostaatweefsel (p -waarde = 0,5994). De resultaten van beide testen worden grafisch weergegeven in figuur 6. De relatieve AMACR expressie wordt hierin logaritmisch gevisualiseerd.

3.3 Expressie van PCA3 en AMACR in het benigne deel van een carcinoom bevattende prostaat

Om de gevoeligheid van de 4 diagnostische testen te benadrukken, wordt het verschil in de relatieve genormaliseerde PCA3- en AMACR-expressie nog eens nagegaan. Dit gebeurt nu enerzijds tussen benigne prostaatweefsel en het benigne deel bij prostaatcarcinoom, anderzijds tussen het maligne en benigne deel aanwezig bij prostaattumoren.

3.3.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test



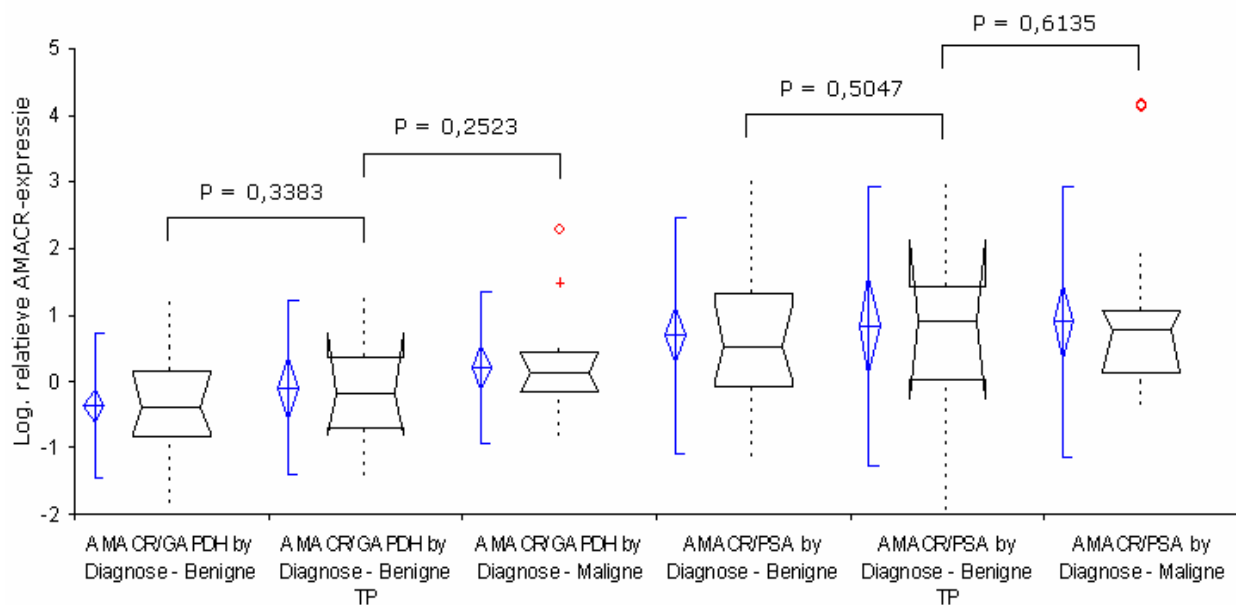
Figuur 7: Logaritmische relatieve PCA3-RNA expressie in benigne en maligne prostaatweefsel versus het benigne weefsel van een carcinoomateuse prostaat. Normalisatie ten opzichte van GAPDH en PSA: n = 60 (26 benigne + 20 maligne + 14 benigne TP biopt).

De PCA3/GAPDH-test vertoont hier een gemiddelde relatieve expressie waarde van 340,6 (range: 0,6-2556,6) in het benigne weefsel afkomstig van een prostaatcarcinoom. De gemiddelde expressie waarden van het benigne prostaatweefsel en het maligne weefsel afkomstig van een prostaatcarcinoom werden eerder vermeld in resultaat 3.2.1. Hieruit kan worden afgeleid dat, vergeleken met benigne prostaatweefsel, het benigne weefsel afkomstig van een carcinoomateuse prostaat een significante PCA3 upregulatie van 30,5 heeft (p-waarde = 0,006). Hiernaast kan ook worden vastgesteld dat het maligne weefsel uit de carcinoomateuse prostaat een PCA3-expressie heeft die significant hoger is (16,4 maal) als deze van het benigne weefsel uit een carcinoom bevattende prostaat (p-waarde = 0,0191). Voor de PCA3/PSA-test wordt een gemiddelde waarde van 7540,6 (range: 1,0-69996,7) waargenomen in het benigne prostaatweefsel waar er sprake is van een carcinoom. De gemiddelde waarde van het benigne weefsel en het maligne weefsel afkomstig van een prostaatcarcinoom werden eveneens eerder vermeld in resultaat 3.2.1. Uit de vergelijking van benigne weefsel afkomstig uit enerzijds gezonde en anderzijds carcinoomateuse

prostaten, kan worden opgemerkt dat de PCA3 expressie een significante toename kent met factor 46,2 in de histologisch aantoonbare aanwezigheid van een prostaattumor elders in het orgaan (p -waarde = 0,0043). Wanneer de gemiddelden van het maligne en benigne weefsel uit de carcinomateuse prostaat worden vergeleken, kan worden opgemerkt dat het maligne weefsel een PCA3 upregulatie van 6,2 vertoont. Het verschil was weliswaar niet significant verschillend (p -waarde = 0,278).

De resultaten van beide testen worden weergegeven in de boxplots van figuur 7. De relatieve PCA3 expressie wordt hierin logaritmisches voorgesteld.

3.3.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test



Figuur 8: Logaritmische AMACR-RNA expressie in benigne en maligne prostaatweefsel versus het benigne weefsel van een carcinomateuse prostaat. Normalisatie ten opzichte van GAPDH: n= 65 (30 benigne + 21 maligne + 14 benigne TP biopt); normalisatie ten opzichte van PSA: n= 63 (28 benigne + 21 maligne + 14 benigne biopt TP).

De AMACR/GAPDH-test geeft een gemiddelde waarde aan van 3,4 (range: 0,0-20,5) in het benigne prostaatdeel bij aanwezigheid van een tumor elders in de prostaat. De gemiddelden van deze test op de benigne en maligne weefsels zijn weergegeven in resultaat 3.2.2. Uit de gemiddelde expressie waarden kan worden opgemerkt dat het benigne weefsel, in aanwezigheid van een prostaattumor, een AMACR expressie heeft die 2,6 maal hoger is als deze van weefsel uit een benigne prostaat. Wanneer dit benigne weefsel uit de carcinomateuse prostaat wordt vergeleken met het maligne weefsel ervan, kan worden opgemerkt dat het maligne weefsel een AMACR upregulatie met factor 3,8 heeft. De verschillen zijn echter niet statistisch significant (respectievelijk p -waarde = 0,338 en p -waarde = 0,252).

Voor de AMACR/PSA-test wordt een gemiddelde expressie waarde van 97,1 (range: 0,0-942,3) waargenomen in benigne prostaatweefsel afkomstig van een carcinomateuse prostaat. De

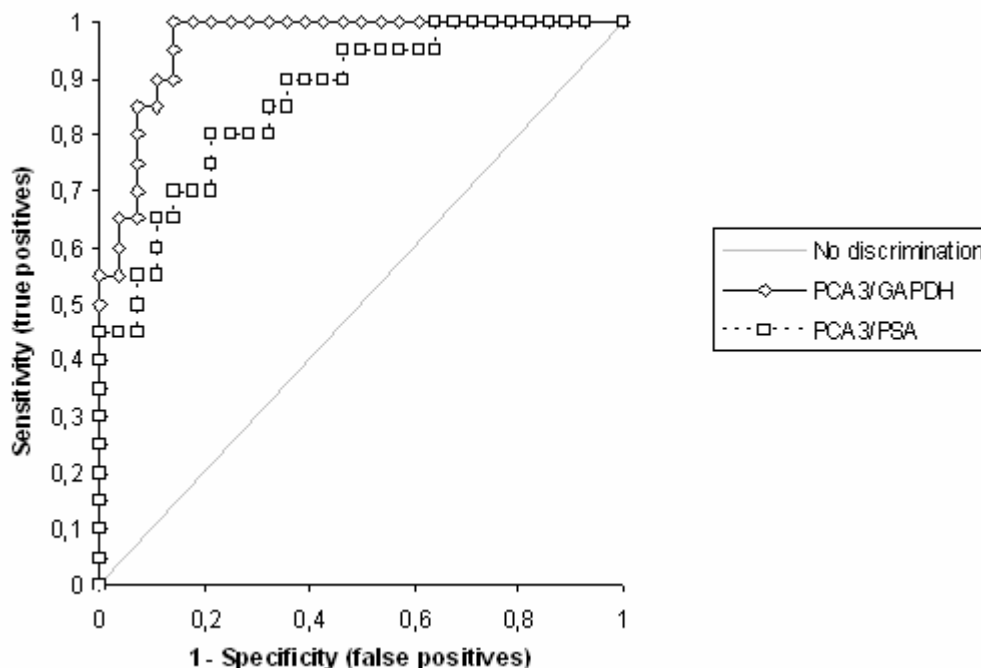
gemiddelde expressie waarden van het benigne en maligne prostaatweefsel staan hierbij weergegeven in resultaat 3.2.2. Uit de vergelijking met deze waarden kon er geen significante toename of afname in AMACR expressie, bepaald met deze test, aangetoond worden ten opzichte van benigne en maligne weefsels respectievelijk (p -waarde = 0,5047 en p -waarde = 0,278).

Bovenstaande resultaten, van beide testen, worden hierbij voorgesteld in figuur 8. De relatieve AMACR expressiewaarden worden uitgezet op een logaritmische schaal.

3.4 Bepaling van de diagnostische performantie van de PCA3/AMACR RT-PCR testen op prostaatweefsel

Om te analyseren in welke mate de relatieve PCA3- en AMACR RNA expressie benigne en maligne prostaatweefsel kan onderscheiden, worden ROC-curves voor elk van de 4 testen geconstrueerd. Met behulp hiervan wordt de efficiëntie en toepasbaarheid van de diagnostische testen op prostaatbiopsies gecontroleerd.

3.4.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test



Figuur 9: ROC-curve van de relatieve PCA3-RNA expressie. Normalisatie PCA3-expressie ten opzichte van GAPDH: AUC= 0,963; n= 48 (28 benigne + 20 maligne); cut-off= 14. De relatieve PCA3-expressie heeft een sensitiviteit (detectie van maligne) van 90,0% en een specificiteit (detectie van benigne) van 87,5%. Normalisatie PCA3-expressie ten opzichte van PSA: AUC= 0,864; n=48 (28 benigne + 20 maligne); cut-off= 620. De relatieve PCA3-expressie heeft een sensitiviteit van 65,0% en een specificiteit van 87,5%.

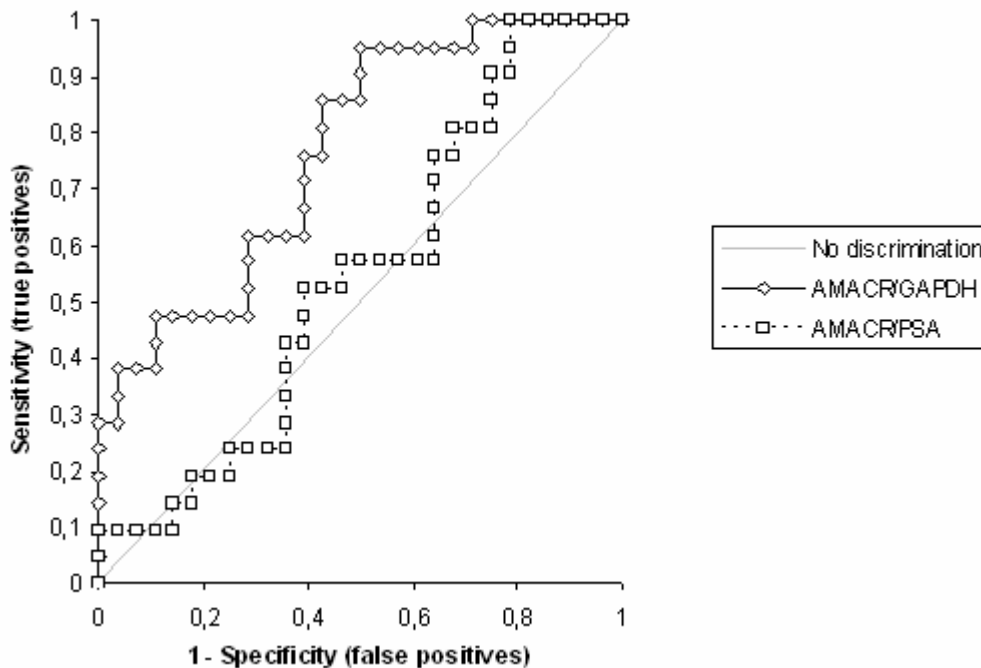
De ROC-curve voor de PCA3/GAPDH-test toont een AUC van 0,963. Verder wordt deze test geassocieerd aan hoge parametrische waarden bij een cut-off waarde van 14. ROC-analyse van de PSA genormaliseerde PCA3-RNA expressie vertoont een AUC van 0,864. Tevens weerspiegelt dit een diagnostische test met goede parametrische waarden wanneer een cut-off waarde van 620 wordt gesteld. De statistische parametrische waarden staan voor iedere test afzonderlijk weergegeven in tabel 11. Tabel C in bijlage 6 stelt de parametrische waarden van de PCA3/GAPDH-test op prostaatweefsel voor, ongeacht een gestelde cut-off waarde.

Bovengenoemde resultaten kunnen afgeleid worden uit figuur 9, waar de ROC-curves van de PCA3-RNA expressie, genormaliseerd ten opzichte van GAPDH (bovenste curve) en PSA (onderste curve), worden weergegeven. Beide curven, corresponderend met de diagnostische testen PCA3/GAPDH en PCA3/PSA, zijn hierbij ver boven de middellijn gelegen en tonen significant een onderscheid aan tussen benigne en maligne prostaatweefsel (p -waarde $< 0,001$). Verder wordt geen significant verschil vastgesteld tussen beide testen onderling (p -waarde = 0,0674).

Tabel 11: Statistische parameters van de 4 diagnostische testen op prostaatweefsel

Test	Cut-off waarde	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	Positief predictieve waarde (%)	Negatief predictieve waarde (%)
PCA3/GAPDH	14	90,0	87,5	81,8	92,3
PCA3/PSA	620	65,0	87,5	76,5	77,4
AMACR/GAPDH	1	61,9	66,7	56,5	71,4
AMACR/PSA	5	52,4	57,1	47,8	61,5

3.4.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test



Figuur 10: ROC-curve van de relatieve AMACR-RNA expressie. Normalisatie AMACR-expressie ten opzichte van GAPDH: AUC= 0,767; n= 51 (30 benigne + 21 maligne); cut-off= 1. De relatieve AMACR-expressie heeft een sensitiviteit van 61,9 % en een specificiteit van 66,7%. Normalisatie AMACR-expressie ten opzichte van PSA: AUC= 0,544; n= 49 (28 benigne + 21 maligne); cut-off= 5. De relatieve AMACR-expressie heeft een sensitiviteit van 52,4% en een specificiteit van 57,1%.

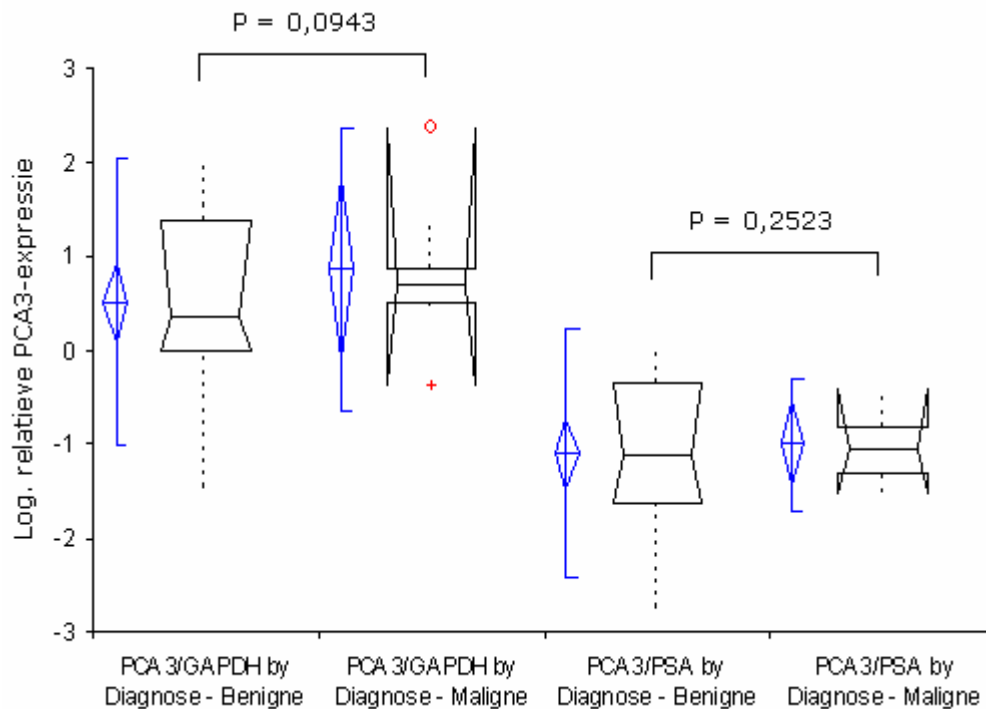
De AMACR/GAPDH-test toont een ROC-curve met een AUC die 0,767 bedraagt. De AMACR/PSA-test wordt gekoppeld aan een AUC van 0,544. De statistische parameters van de GAPDH en PSA genormaliseerde AMACR-test, verkregen bij een cut-off waarde van respectievelijk 1 en 5, staan hierbij eveneens weergegeven in tabel 11.

In figuur 10 worden bovenstaande resultaten weergegeven met behulp van ROC-curves. In de eerste diagnostische test, waarbij de AMACR-RNA expressie genormaliseerd wordt ten opzichte van GAPDH, is de overeenkomstige ROC-curve (bovenste curve) redelijk boven de middellijn gesitueerd. Tevens is deze test gekoppeld aan een p-waarde kleiner dan 0,001 hetgeen duidt op de mogelijkheid significant te kunnen onderscheiden tussen benigne en maligne prostaatweefsel. De tweede test, waarbij de normalisatie plaatsvindt ten opzichte van PSA, geeft een ROC-curve (onderste curve) weer die lichtjes boven, al dan niet samenvallend gelegen is met de middellijn. Verder wordt bij deze test een P-waarde van 0,2975 vastgesteld. In vergelijking met de PCA3-testen wijzen de waarnemingen op de beduidend mindere mate waarin de AMACR-testen geschikt zijn voor het onderscheiden tussen benigne en maligne weefsel.

3.5 Expressie van PCA3 en AMACR in prostaatmassage vocht afkomstig van een benigne of maligne prostaat

Om de diagnostische gevoeligheid van de PCA3- en/of AMACR-test na te gaan op prostaatmassage vocht, wordt het verschil in gemiddelde relatieve expressie van beide genen gecontroleerd aan de hand van boxplots.

3.5.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test

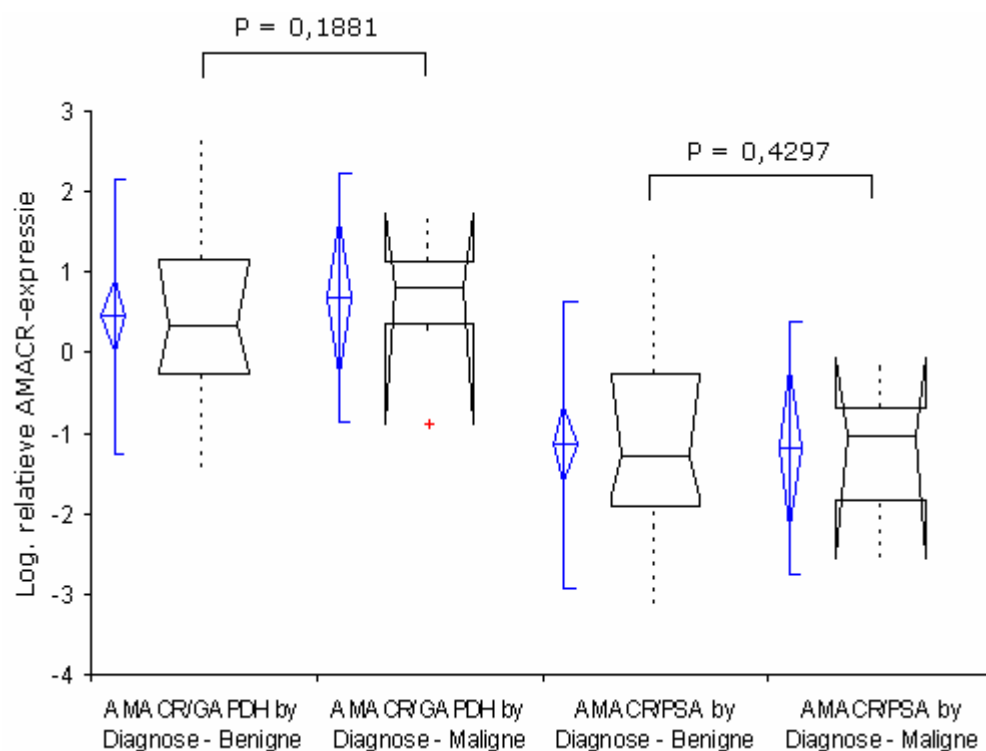


Figuur 11: Logaritmische relatieve PCA3-RNA expressie, genormaliseerd ten opzichte van GAPDH en PSA, in prostaatmassage vocht van patiënten met een benigne versus maligne prostaat. (n= 35; 29 benigne + 6 maligne)

Bij de PCA3/GAPDH-test wordt een gemiddelde expressie waarde opgemerkt van 12,0 (range: 0,0-109,1) en 44,5 (range: 0,4-229,9) in prostaatmassage vocht van respectievelijk de benigne en de maligne populatie. Dit duidt hierbij op een toegenomen genormaliseerde PCA3 expressie met factor 3,7 in de aanwezigheid van een prostaatcarcinoom. Doch, het verschil was niet significant verschillend (p-waarde = 0,0943). De PCA3/PSA-test geeft een gemiddelde expressie waarde van 0,19 (range: 0,0-1,1) in de benigne en 0,17 (range: 0,0-0,4) in de maligne patiëntpopulatie. Een significante PCA3-RNA overexpressie in aanwezigheid van prostaatcarcinoom wordt ook door deze test niet opgemerkt (p-waarde = 0,2523).

De resultaten worden grafisch voorgesteld in figuur 12. De PCA3-RNA expressiewaarden worden uitgetzet op een logaritmische schaal.

3.5.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test



Figuur 12: Logaritmische relative AMACR-RNA expressie, genormaliseerd ten opzichte van GAPDH en PSA, in prostaatmassage vocht van patiënten met een benigne versus maligne prostaat. (n= 35; 29 benigne + 6 maligne)

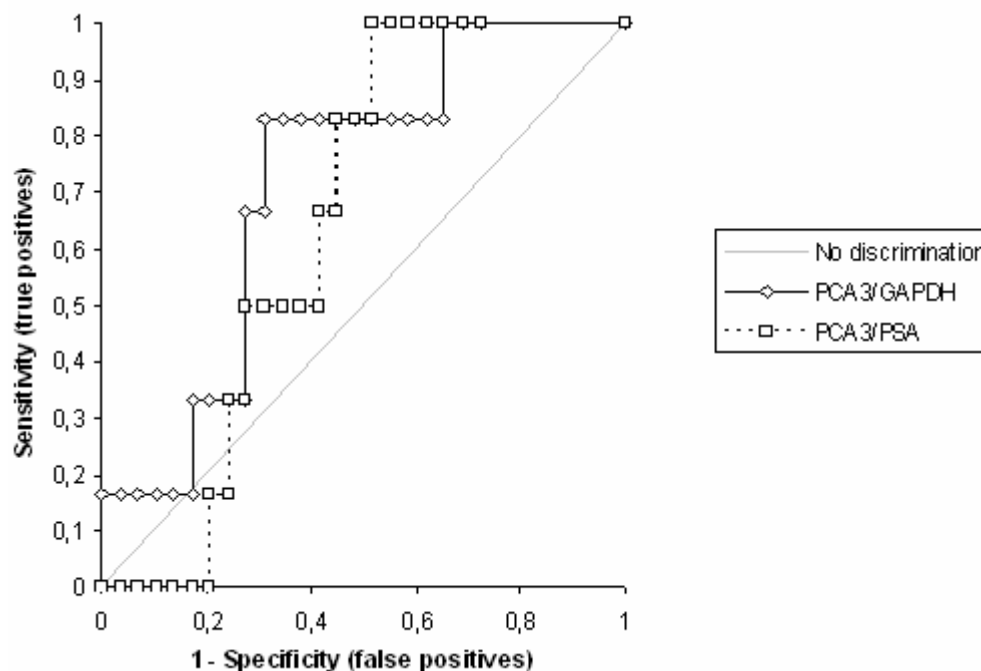
De gemiddelde AMACR-RNA expressie met de AMACR/GAPDH-test, stemt hier overeen met een waarde van 28,2 (range: 0,0-463,0) en 16,2 (range: 0,1-54,8) in prostaatmassage vocht van patiënten met respectievelijk een benigne en maligne prostaat. Hieruit kan geen significante toename in AMACR expressie worden gesteld in de aanwezigheid van een prostaatcarcinoom (p-waarde = 0,1881). De AMACR/PSA-test toont een gemiddelde relatieve expressie van 0,9 (range: 0,0-20,4) in de benigne populatie en 0,2 (range: 0,0-0,9) in de maligne populatie. Eveneens wordt door deze test geen significant verschillende AMACR-RNA expressie opgemerkt tussen patiënten met een benigne en maligne prostaat (p-waarde = 0,4297).

In figuur 13 worden deze bevindingen grafisch geïllustreerd. De AMACR-RNA expressiewaarden worden weergegeven op een logaritmische schaal.

3.6 Bepaling van de diagnostische performantie van de PCA3/AMACR RT-PCR testen op prostaatmassage vocht

Om na te gaan in hoeverre de 4 diagnostische testen patiënten met een benigne en maligne prostaat kan onderscheiden op een niet invasieve manier, wordt de relatieve PCA3- en AMACR RNA expressie in prostaatmassage vocht geanalyseerd. Tevens worden de statistische parameters van de testen bepaald. Dit wordt grafisch uitgevoerd aan de hand van ROC-curves die voor elk van de 4 testen wordt geconstrueerd. Uiteindelijk wordt hierdoor de toepasbaarheid van deze niet invasieve diagnostische testen op prostaatmassage vocht gecontroleerd. Verder wordt de test met de hoogste diagnostische performantie vergeleken met de klassieke serologische PSA-test.

3.6.1 PCA3/GAPDH- en PCA3/PSA-test



Figuur 13: ROC-curve van de relatieve PCA3-RNA expressie. Normalisatie PCA3-expressie ten opzichte van GAPDH: AUC= 0,718; n= 35 (29 benigne + 6 maligne); cut-off= 4. De relatieve PCA3-expressie heeft een sensitiviteit van 66,7 % en een specificiteit van 72,4%. Normalisatie PCA3-expressie ten opzichte van PSA: AUC= 0,649; n=35 (29 benigne + 6 maligne); cut-off= 0,11. De relatieve PCA3-expressie heeft een sensitiviteit van 50,0% en een specificiteit van 72,4%.

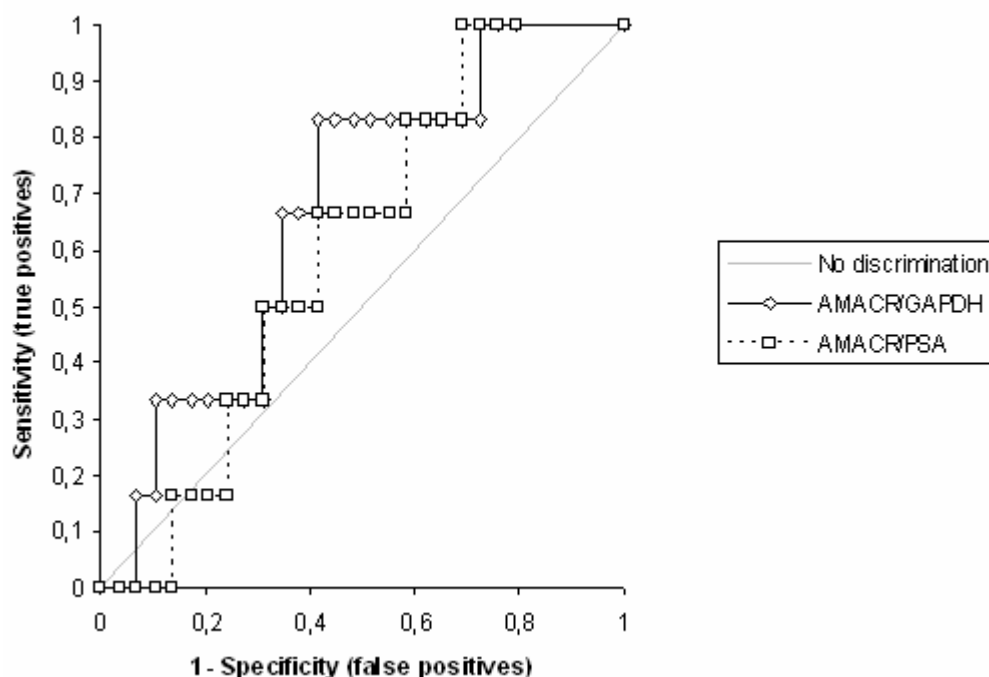
De ROC-curve voor de PCA3/GAPDH-test toont een AUC van 0,718. Wanneer een cut-off waarde van 4 wordt gesteld, wordt deze test gekoppeld aan statistische parameters dewelke voorgesteld worden in tabel 11. PSA normalisatie van de PCA3-RNA expressie geeft een AUC van 0,649 weer. De verkregen statistische parameters bij deze test, eveneens voorgesteld in tabel 11, stemmen overeen met deze van bij een cut-off waarde van 0,11. Tabel D in bijlage 7 geeft de statistische parametrische waarden van de PCA3/GAPDH-test op prostaatmassage vocht weer, ongeacht een gestelde cut-off waarde.

Bovenstaande resultaten kunnen opgemerkt worden in figuur 14, waar de ROC-curves worden weergegeven van de PCA3-RNA expressie, genormaliseerd ten opzichte van GAPDH (bovenste curve) en PSA (onderste curve). Beide curven die overeenstemmen met de diagnostische testen PCA3/GAPDH en PCA3/PSA, zijn hierbij voor het grootste deel gelegen boven de middellijn en kunnen significant een onderscheid kunnen aantonen tussen de relatieve PCA3-expressie in patiënten met een benigne en maligne prostaat (p-waarde van 0,0155 en 0,0488 respectievelijk).

Tabel 12: Statistische parameters van de 4 diagnostische testen op prostaatmassage vocht

Test	Cut-off waarde	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	Positief predictieve waarde (%)	Negatief predictieve waarde (%)
PCA3/GAPDH	4	66,7	72,4	33,3	91,3
PCA3/PSA	0,11	50,0	72,4	27,3	87,5
AMACR/GAPDH	4,5	50,0	69,0	25,0	87,0
AMACR/PSA	0,1	50,0	65,5	23,1	86,4
Serologische PSA	4	100	44,8	27,3	100

3.6.2 AMACR/GAPDH- en AMACR/PSA-test



Figuur 14: ROC-curve van de relatieve AMACR-RNA expressie. Normalisatie AMACR-expressie ten opzichte van GAPDH: AUC= 0,672; n= 35 (29 benigne + 6 maligne); cut-off= 4,5. De relatieve AMACR-expressie heeft een sensitiviteit van 50,0% en een specificiteit van 69,0%. Normalisatie AMACR-expressie ten opzichte van PSA: AUC= 0,603; n= 35 (29 benigne + 6 maligne); cut-off= 0,1. De relatieve AMACR-expressie heeft een sensitiviteit van 50,0% en een specificiteit van 65,5%.

De bovenste ROC-curve weerspiegelt de AMACR/GAPDH-test die samengaat met een AUC van 0,672. De AMACR/PSA-test toont een ROC-curve met een AUC van 0,603. Verder worden beide testen geassocieerd aan specifieke statistische parameters waarvan de individuele waarden voorgesteld worden in bovenstaande tabel (tabel 11). Om deze waarden te verkrijgen, werd een cut-off van 4,5 en 0,1 gesteld bij respectievelijk een normalisatie ten opzichte van GAPDH en PSA. De resultaten worden in figuur 16 voorgesteld aan de hand van ROC-curves. Deze curves stemmen hierbij overeen met de GAPDH (bovenste curve) en de PSA (onderste curve) genormaliseerde AMACR-RNA expressie in prostaatmassage vocht afkomstig van patiënten met een benigne en maligne prostaat. De AMACR/GAPDH-test is niet ver boven de middellijn gelegen en wordt geassocieerd aan een p-waarde van 0,0561, hetgeen wijst op het gebrek van de test een significant onderscheid te kunnen maken tussen de aan- of afwezigheid van een prostaatkarcinoom. De AMACR/PSA-test geeft een ROC-curve weer die in het begin samenvalt met de middellijn en er dan lichtjes boven gelegen is. Tevens wordt deze diagnostische test gekoppeld aan een p-waarde van 0,1626 wat aantoont dat ook deze test in veel mindere mate geschikt is voor het opsporen van prostaatkarcinoom in urine.

3.6.3 Vergelijking van de PCA3/GAPDH-test met de klassieke serologische PSA-test

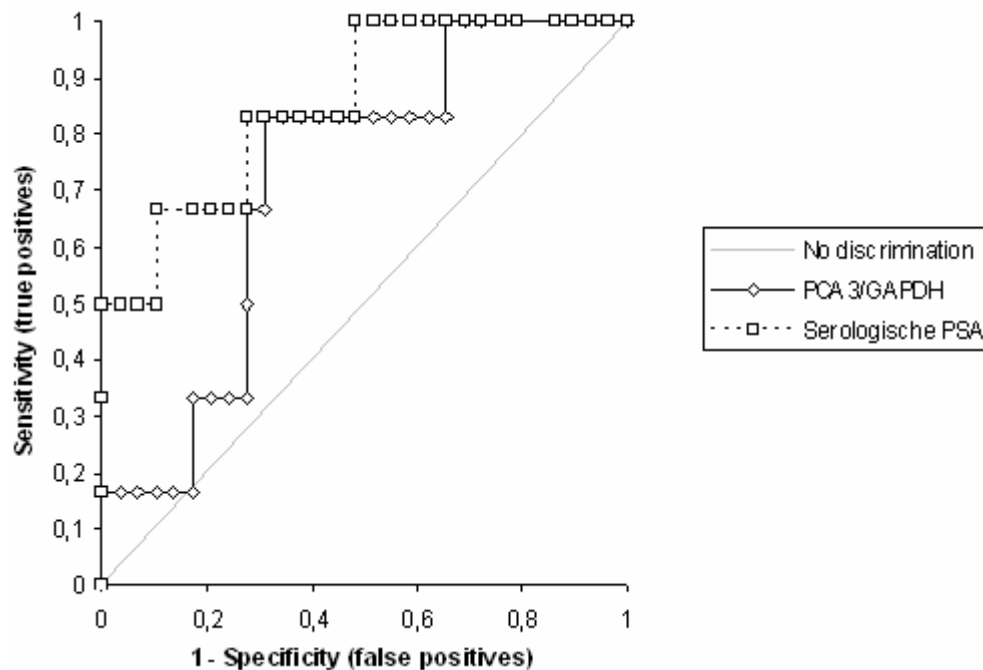


Figure 15: ROC-curve van de serologische PSA-test. AUC= 0,856; n= 35 (29 benigne + 6 maligne); cut-off= 4. De relatieve PSA-expressie heeft een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 44,8%.

De ROC-curve die overeenstemt met de klassieke serologische PSA-test, vertoont een AUC van 0,856. Bij een cut-off waarde van 4, wordt de test gekoppeld aan statistische parameters dewelke

voorgesteld worden in tabel 11. De ROC-analyse van de PCA3/GAPDH-test werd eerder beschreven in resultaten 3.6.1.

Bovenstaande resultaten worden weergegeven in figuur 16. De bovenliggende ROC-curve stemt hierbij overeen met de serologische PSA-test, de onderliggende met de PCA3/GAPDH-test. Verder blijken beide testen significant een carcinoom bevattende prostaat te kunnen aantonen (PSA-test: p-waarde < 0,001; PCA3/GAPDH-test: p-waarde = 0,0155).

4. Discussie

Hedendaags blijkt het prostaatcarcinoom nog steeds verantwoordelijk voor een zéér groot gezondheidsprobleem in de mannelijke bevolking. In tegenstelling tot de makkelijker te behandelen lokale prostaatcarcinomen, worden gemetasteerde prostaattumors veeleer geassocieerd met een progressief verloop en een slechte prognose, waardoor een efficiënte, vroegtijdige diagnose (screening) van prostaatcarcinoom een absolute prioriteit is.¹⁻⁷ Een eerste test die uit intensief onderzoek voortvloeide, is de serologische bepaling van PSA (PSA-test). Desondanks het feit dat de test voor een aanzienlijke toename in de vroegtijdige detectie van prostaatkanker zorgde, kon een dalende mortaliteit ten gevolge aan deze ziekte niet worden waargenomen. De lage specificiteit en lage positief predictieve waarde van de PSA-test wordt hiervoor als reden aangeduid. Dit is te wijten aan het feit dat PSA in het serum ook verhoogd kan zijn bij goedaardige aandoeningen van de prostaat, zoals BPH. Bovendien wordt deze test geassocieerd aan een overdiagnose van prostaatcarcinoom.^{1-4,6,12} Ondanks de veelbelovende verwachtingen van de PSA-test, wordt de efficiëntie van het PSA gen als marker meer en meer in vraag gesteld. Hierdoor is er een grote belangstelling gerezen omtrent de ontwikkeling van technieken die een vroegtijdige detectie van prostaatcarcinoom toelaten, dit weliswaar met een hoge sensitiviteit en specificiteit. Dit heeft ertoe geleid dat onderzoek naar nieuwe potentiële markers voor prostaatcarcinoom de laatste jaren intensief heeft plaatsgevonden, zodat de vroegtijdige detectie van deze aandoening specifiek kan optreden. Op deze manier werd de karakteristieke overexpressie van het PCA3 gen (>95%) bij prostaatcarcinomen ontdekt. Aangezien het PCA3 gen hedendaags als één van de meest specifieke markers voor prostaatcarcinoom wordt aanzien, kan een hoge sensitiviteit en specificiteit van PCA3-gebaseerde testen verzekerd worden.^{1,13-18} Naast dit veelbelovende gen, werden recent andere specifieke kandidaat-markers geïdentificeerd. Eén hiervan is het AMACR gen waarvan mRNA overexpressie in prostaattumoren kon worden geconstateerd.²⁰⁻²⁴ Nader onderzoek heeft echter kunnen aantonen dat AMACR ook tot expressie wordt gebracht in BPH en, onder normale fysiologische condities, in andere non prostaatweefsels zoals de lever, hersens en nieren.²⁵ Bijgevolg zou een test gebaseerd op dit gen een lage specificiteit hebben waardoor de betrouwbaarheid van deze moleculaire kandidaat-marker in twijfel wordt getrokken. Verder onderzoek dient dus in de toekomst uitgevoerd te worden, zodat de toepasbaarheid en mogelijke verdienste van AMACR in de vroegtijdige diagnose van prostaatcarcinoom kan worden opgeklaard.

Gedurende deze studie werd een test ontwikkeld voor de accurate kwantificatie van het PCA3- en AMACR-RNA. Voor toepassing van de test in de diagnostiek van prostaatcarcinoom, werd geopteerd de relatieve RNA expressie van PCA3 en AMACR te meten. Om dit te bereiken werd het expressie niveau van beide genen genormaliseerd ten opzichte van het expressieniveau van het huishoudgen GAPDH en het prostaat specifieke PSA-RNA. Hierdoor werden uiteindelijk 4 afzonderlijke diagnostische testen verkregen, namelijk PCA3/GAPDH, PCA3/PSA, AMACR/GAPDH en AMACR/PSA. Normalisatie ten opzichte van GAPDH of PSA garandeert een correctie voor de RNA-input en de RT-stap. Tevens biedt dit de mogelijkheid om aan te tonen of er sprake is van een onder- of overexpressie van deze genen in prostaat (tumor)cellen. De resultaten werden verder uitgedrukt als een relatieve onder- of overexpressie ten opzichte van een welbepaald calibratorstaal met

relatieve expressie van PCA3 of AMACR (ten opzichte van GAPDH of PSA) van 1 (= comparatieve kwantificatie).

Na de ontwikkeling van de geoptimaliseerde RT-PCR, werd in deze studie het verschil in PCA3- en AMACR-RNA expressie tussen benigne en maligne prostaatweefsel gecontroleerd. 66 prostaatweefsel bipten, verkregen door TURP of TP, werden hiervoor geanalyseerd. Slechts 2 ervan werden niet meegenomen in de statistische analyse, aangezien deze geen PSA-RNA expressie vertoonden na normalisatie ten opzichte van GAPDH. Dit wijst immers op onvoldoende hoeveelheid aan RNA afkomstig van de prostaat. Van de overgebleven 64 weefselbiopsies, waren er 30 histologisch getypeerd als zijnde benigne. De andere 34 weefselstalen waren afkomstig van een carcinomateuse prostaat. Hiervan waren er histologisch 20 als maligne getypeerd en 14 als het benigne deel van een carcinoom bevattende prostaat. Zowel de PCA3/GAPDH-test als de PCA3/PSA-test vertoonden op de prostaat weefselstalen een significant verschil in gemiddelde relatieve expressie tussen maligne en benigne weefsels (5587,5 versus 11,2, p-waarde < 0,001 voor PCA3/GAPDH; 46645,3 versus 163,3, p-waarde < 0,001 voor PCA3/PSA). Ook kon worden vastgesteld dat bij normalisatie ten opzichte van het huishoudgen GAPDH deze overexpressie in de maligne groep (~500 maal) duidelijk meer uitgesproken is dan bij normalisatie ten opzichte van PSA (~286). Dit suggereert dat deze test (PCA3/GAPDH) nog specifiek en nauwkeuriger het onderscheid zou kunnen maken tussen benigne en maligne prostaatweefsel. In tegenstelling tot de PCA3-testen, blijkt enkel de AMACR/GAPDH-test een significant verschillende gemiddelde relatieve RNA expressie te kunnen aantonen tussen maligne en benigne prostaatweefsel (12,7 versus 1,3, p-waarde < 0,05). Tevens toont deze test een upregulatie in gemiddelde relatieve AMACR-RNA expressie aan met factor 9,9 in maligne prostaatweefsel. Ondanks een upregulatie ook kon worden waargenomen bij de AMACR/PSA-test (factor 7,2), blijkt deze test niet significant een verschil te kunnen aantonen tussen de gemiddelde relatieve RNA expressie van de benigne en maligne populatie (661,6 versus 91,3, p-waarde = 0,5994). Hieruit zou dus kunnen blijken dat de eerste test (AMACR/GAPDH) het best prostaatcarcinoom kan aantonen. Uit de vaststellingen kon verder ook een beduidend hogere gemiddelde relatieve RNA upregulatie in maligne prostaatweefsel worden opgemerkt bij de PCA3/GAPDH-test dan bij de AMACR/GAPDH-test. Een sterke stijging is van groot belang aangezien dit aantoont dat detectie van enkele tumorcellen in een populatie van gezonde cellen efficiënt zou kunnen plaatsvinden.¹⁴ De slechts zwakke relatieve overexpressie van AMACR in maligne versus benigne prostaatweefsel suggereert een lage specificiteit van expressie van dit gen in prostaatcarcinoom en in prostaatweefsel in het algemeen. In dit onderzoek werd inderdaad bevestigd dat AMACR ook tot expressie komt in leukocyten.

De sterke relatieve overexpressie van PCA3 in prostaattumorweefsel, kan de mogelijkheid bieden tot het detecteren van een klein aantal maligne prostaatcellen die aangetroffen kunnen worden in prostaatweefsel én in prostaat massagevocht. Dit wordt eveneens ondersteund door de bevinding van de PCA3/GAPDH-test en PCA3/PSA-test dat ook het benigne deel van een carcinoom bevattende prostaat een significante overexpressie vertoont van respectievelijk gemiddeld 340,6 (p-waarde = 0,006) en 7540,6 (p-waarde = 0,0043). Dit zou kunnen wijzen op de aanwezigheid van micrometastasen in de histologisch benigne beoordeelde delen van de prostaat die met deze moleculaire testen wél gedetecteerd worden. Hedendaags worden prostaatbiopsies nog steeds exclusief geanalyseerd met behulp van histopathologische technieken waarbij slechts een kleine fractie van het weefsel wordt onderzocht. Aangezien hierdoor de kans bestaat dat aanwezige

prostaatcarcinomen of micrometastasen gemist worden, lijkt toekomstgericht voornamelijk de detectie van PCA3-RNA overexpressie in prostaatweefsel een aanvullende of vervangende test te kunnen zijn in de diagnostiek van prostaatcarcinoom. Naast de meer uitgesproken overexpressie van PCA3, kan het RNA van dit gen, in tegenstelling tot dat van AMACR, niet worden aangetoond in leukocyten. Aangezien deze cellen ook frequent aanwezig zijn in lichaamsvloeistoffen, kan enkel bij kwantificatie van het PCA3 RNA de afwezigheid van vals positieven verzekerd worden.¹⁴

In tweede instantie werden de sensitiviteit en specificiteit van de 4 diagnostische testen op prostaatweefsel (PCA3/GAPDH, PCA3/PSA, AMACR/GAPDH en AMACR/PSA) geanalyseerd aan de hand van individuele ROC-curves. Deze resultaten blijken de capaciteit van beide genen om een onderscheid te maken tussen benigne en maligne prostaatweefsel te bevestigen. Ook bevestigt dit dat PCA3 overduidelijk een betere diagnostische moleculaire marker blijkt te zijn dan AMACR. Dit kan worden geconcludeerd uit de bevindingen dat de GAPDH genormaliseerde PCA3-test, bij een cut-off waarde van 14, beschikt over een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 90,0% en 87,5%. Bij de PCA3/PSA-test (cut-off = 620) werd een sensitiviteit van 65,0% en een specificiteit van 87,5% bekomen. Ondanks de test een lagere waarde voor beide statistische parameters vertoont, werd geen significant verschil tussen beide diagnostische testen waargenomen. Verder werd ook aangetoond dat zowel de PCA3/GAPDH- als de PCA3/PSA-test gekoppeld is aan een positief en negatief predictieve waarde van respectievelijk 81,8% en 92,3%, én 76,5% en 77,4%. In tegenstelling tot de gebleken toepasbaarheid van de PCA3-testen in het nauwkeurig aantonen van maligne prostaatweefsel, blijken beide diagnostische testen van AMACR dit in een beduidend mindere mate te kunnen. Uit de resultaten kon worden vastgesteld dat de AMACR/GAPDH-test de mogelijkheid biedt significant maligne prostaatweefsel te onderscheiden van benigne (p-waarde < 0,001), dit weliswaar met een sensitiviteit van 61,9% en een specificiteit van 66,7% (cut-off = 1). Ondanks de goede p-waarde dus een goede diagnostische test doet vermoeden, wordt de efficiëntie van deze test sterk ingeperkt door deze lage statistische parametrische waarden. De resultaten van de AMACR/PSA-test tonen echter aan dat deze diagnostische test niet beschikt over de capaciteit beide prostaatweefsel populaties significant van elkaar te onderscheiden (p-waarde = 0,2975). Tevens werd de test ook gekoppeld aan een uitermate lage sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 52,4% en 57,1% (cut-off = 5). Naast deze bevindingen werden beide AMACR-testen ook geassocieerd aan een lage positief en negatief predictieve waarde (56,5% en 71,4% voor AMACR/GAPDH; 47,8% en 61,5% voor AMACR/PSA). Deze waarnemingen bevestigen dat de AMACR-gebaseerde testen, in vergelijking met de PCA3-testen, veel minder geschikt zijn voor het onderscheiden van benigne en maligne prostaatweefsel.

Deze studie toont dus aan dat kwantitatieve analyse van PCA3-RNA expressie, gebruik makend van een RT-PCR assay, efficiënt prostaatcarcinoom kan detecteren in prostaatweefsel. Tevens blijkt deze analyse de aandoening met hoge sensitiviteit en specificiteit te kunnen differentiëren van benigne prostaatweefsel. Dit stemt hierbij volledig overeen met de bevindingen die eerder werden gepubliceerd in de studie van De Kok et al.¹⁴ Verder werd ook door Schmidt et al. aangetoond dat de relatieve RNA expressie van PCA3 significant verhoogd is in maligne prostaatweefsel (p < 0,001). In tegenstelling tot het in onze studie aangewende huishoudgen GAPDH, werd in deze studie geopteerd voor TBP als referentie gen. Dit omwille van de reden dat enkel TBP een significant verschillend expressiepatroon vertoonde tussen maligne en benigne prostaatweefsel. Hiernaast werd door ROC-analyse ook aangetoond dat PCA3 een efficiënte tumormarker is met een

AUC van 0,85. In onze studie werd echter voor de relatieve PCA3-RNA expressie, waarbij PCA3 genormaliseerd werd ten opzichte van GAPDH, een ROC verkregen met een AUC van 0,963. Daar de AUC een schatting weergeeft voor de mate waarin een correcte diagnose kan worden gesteld,²⁷ blijkt onze GAPDH genormaliseerde PCA3-test meer geschikt voor het vroegtijdig opsporen van tumorcellen in maligne prostaatweefsel. Tevens werd ook een hogere AUC (0,864) gevonden bij onze PCA3/PSA-test, hetgeen een hogere efficiëntie van ook deze test voorspelt. Beide PCA3-testen, ontwikkeld in deze studie, blijken dus hun toepassing te kunnen verlenen in de diagnose van prostaatacarcinoom op prostaatbiopten.

De minder goede performantie van de AMACR-gebaseerde testen, aangetoond in deze studie, is tegenstrijdig met de resultaten bekomen in de studie van Schostak et al. Hierin werd immers aangetoond dat een kwantitatieve RT-PCR assay die AMACR transcripten detecteert, prostaatkanker kan differentiëren van BPH met een hoge specificiteit (85,6%) en aanvaardbare sensitiviteit (64,9%). Een verschil tussen deze studie en die van ons, is dat bij de studie van Schostak et al de AMACR-RNA expressie enkel genormaliseerd werd ten opzichte van het huishoudgen PBGD, terwijl bij onze studie normalisatie plaatsvond ten opzichte van zowel het huishoudgen GAPDH als het prostaat specifieke gen, PSA. Wanneer we onze AMACR/GAPDH-test echter vergelijken met de PBGD genormaliseerde test van Schostak et al, kan worden vastgesteld dat de sensitiviteit tussen beiden testen niet noemenswaardig verschilt (61,9% versus 64,9%). Daarentegen neemt de specificiteit, in tegenstelling tot die van onze test (66,7%), een veel hogere waarde aan bij deze van Schostak et al, namelijk 85,6%. Dit duidt hierbij op de hogere efficiëntie van deze laatste RT-PCR test in de vroegtijdige diagnostiek en screening van prostaatacarcinoom.

Nadat de relatieve PCA3- en AMACR-RNA overexpressie kon worden bevestigd in maligne prostaatweefsel en aangetoond werd dat de PCA3-testen en in mindere mate de AMACR-testen hun toepassing kunnen verlenen in de gevoelige detectie van prostaat carcinoomcellen in prostaatweefselbiopsies, werd de efficiëntie van deze diagnostische testen op prostaatmassage vocht nagegaan. Slechts 2 urinestalen waren niet bruikbaar voor analyse omwille van een te lage PSA-RNA hoeveelheid, wijzend op de lage aanwezigheid van prostaatcellen in het prostaatmassage vocht. Uiteindelijk werd de studie uitgevoerd met behulp van 34 urinestalen waarvan 29 als benigne en 6 als maligne geklasseerd werden op basis van de histologische beoordeling van een TURP-biopt (indien uitgevoerd), of op basis van de gecombineerde resultaten van klinisch onderzoek, PSA-test en TRUS alleen.

Vooreerst werd het verschil in gemiddelde relatieve expressie van beide genen op de maligne versus de benigne urinestalen nagegaan. Geen van beide PCA3- (PCA3/GAPDH en PCA3/PSA) en AMACR-(AMACR/GAPDH en AMACR/PSA) urinetesten konden hierbij een statistisch significant verschil aantonen (p -waarden $> 0,05$) omwille van een grote overlap van de expressieniveaus tussen beide groepen.

Om verder de toepasbaarheid van de niet-invasieve diagnostische testen op urine na te gaan, werden nadien de ROC-curve, en de hieruit afgeleide statistische parameters, van iedere test afzonderlijk bepaald. Hiermee wordt immers aangetoond in hoeverre deze testen een maligne toestand kunnen onderscheiden van een benigne. Uit de resultaten kan vastgesteld worden dat zowel de PCA3/GAPDH- als de PCA3/PSA-urinetest significant een onderscheid kan aantonen tussen de gemiddelde relatieve RNA expressie in patiënten met een benigne en maligne prostaat (AUC = 0,718, p -waarde = 0,0155 voor PCA3/GAPDH; AUC = 0,649, p -waarde = 0,0488 voor

PCA3/PSA). Verder werd bij GAPDH en PSA normalisatie een test verkregen met een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 66,7% en 72,4% (cut-off = 4), en 50,0% en 72,4% (cut-off = 0,11). Bovendien gaan beide testen samen met een lage positief en hoge negatief predictieve waarde (33,3% van 91,3% voor PCA3/GAPDH; 27,3% en 87,5% voor PCA3/PSA). Ondanks dus beide PCA3-urinetesten geassocieerd zijn aan een significante p-waarde en eenzelfde specificiteit (72,4%), blijkt de PCA3/GAPDH-test een beter diagnostisch en screening tool voor de detectie van prostaatcarcinoom. Dit omwille van de reden dat deze test beschikt over een beduidend hogere gevoeligheid en hogere predictieve waarden dan de PSA genormaliseerde test. Aangezien echter GAPDH in ieder celtype tot expressie wordt gebracht en verschillende celtypes aanwezig kunnen zijn in urine, zou normalisatie van de PCA3-RNA expressie beter plaatsvinden ten opzichte van een gen dat overeenstemt met het totale aantal van normale en carcinomateuse prostaat epitheelcellen, aanwezig in prostaatsecreties. Om deze reden zou dus de PCA3/PSA-test een specifiekere diagnose en screening van prostaatcarcinoom in urine verzekeren²⁵, wat echter door onze resultaten statistisch niet aangetoond werd. Uit de resultaten van de ROC-analyse kon verder worden waargenomen dat beide AMACR-testen, AMACR/GAPDH en AMACR/PSA, geen significante p-waarde vertonen (respectievelijk 0,0561 en 0,1626). Dit wijst erop dat beide testen, indien uitgevoerd op prostaatmassage vocht, de capaciteit ontbreken een significant onderscheid te kunnen maken tussen een benigne en maligne prostaat.

In deze studie, toont ROC-analyse een betere diagnostische performantie van de serologische PSA-test ten opzichte van de beste RT-PCR-test op prostaatmassage vocht, met name de PCA3/GAPDH-urinetest (AUC 0.856 versus 0.718). Doch, de specificiteit was beduidend lager dan die van de in deze studie ontwikkelde RT-PCR testen (cfr. tabel 12). Dit resultaat weerspiegelt het gekende probleem van de serologische PSA-test. Het suggereert ook dat de PCA3/GAPDH-test zou kunnen gepositioneerd worden als diagnostische test voor patiënten met verhoogde serum-PSA, om onnodige biopsienamen te vermijden.

Voor het feit dat een significante RNA overexpressie van PCA3 en AMACR wel kon worden aangetoond in maligne prostaatweefsel en niet in urine-excreties van patiënten met een carcinoom, en voor de minder goede diagnostische performantie van de testen op prostaatmassage vocht, kunnen verschillende mogelijke verklaringen aangehaald worden. Vooreerst is het aantal geanalyseerde stalen, vooral die geklasseerd als maligne, laag wat een beperkende factor is in de analyse. Vals negatieve resultaten op urinestalen kunnen verklaard worden doordat er geen zekerheid bestaat betreffende de aanwezigheid van maligne prostaatcellen in de urine na uitvoering van de prostaatmassage. Hierbij bestaat dus de beperking dat ook via deze niet-invasieve test de detectie van prostaatcarcinoom kan worden gemist. Vals positieve resultaten anderzijds, zijn mogelijk te wijten aan een miskennis van de diagnose en een verkeerde klassering. Indeling was immers veelal gebeurd op basis van klinisch onderzoek, PSA-test en TRUS, zonder biopsienamen. TURP en histologisch onderzoek van het biopt en/of opvolging van deze patiënten met vals positieve resultaten is aangewezen om een eventueel carcinoom alsnog aan te tonen of uit te sluiten. Hierbij is het bovendien niet uitgesloten dat ook via TURP en histologie, een carcinoom gemist wordt, en dat, zoals hoger bediscussieerd voor de test op prostaatweefsel, de RT-PCR test op prostaatmassage vocht een superieure gevoeligheid heeft ten opzichte van alle andere onderzoeken, inclusief TURP, voor de detectie van prostaatcarcinoom.

Dit wordt ondersteund door de studie van Marks LS et al, waarin werd aangetoond dat in mannen die een herhaalde prostaatbiopsie ondergingen om prostaatkarcinoom uit te sluiten, de PCA3 urinetest een betere uitslag kon voorspellen dan de bepaling van het serum PSA. Hieruit kon worden geconcludeerd dat de PCA3-test een belangrijke rol kan spelen in de diagnose van prostaatkanker. Gedurende de studie werd de PCA3-RNA expressie genormaliseerd ten opzichte van PSA, en werd deze test vervolgens vergeleken met het serum PSA gehalte. Verder werd in deze studie een AUC van 0,68 verkregen voor de PCA3/PSA urinetest. Aangezien bij onze test (PCA3/GAPDH) hiervoor een hogere waarde kon worden vastgesteld (AUC = 0,718), wijst dit op de betere mate waarin onze test een correcte diagnose kan stellen. Uit de vergelijking van de PCA3/PSA-test met de serologische PSA-test bij Mark et al werd aangetoond dat de urinetest een specifiekere diagnose van prostaatkarcinoom kan waarborgen. Recent werd door Tomlins et al de 'Cancer Outlier Profile Analysis' (COPA) ontwikkeld, een techniek die de significante overexpressie van een gen kan opsporen in een welbepaalde aandoening. Tevens werden door deze methode al verschillende genen geïdentificeerd waarvan de karakteristieke DNA herschikking of verhoogde amplificatie in het ziektebeeld geweten is. Uit doeltreffend onderzoek met deze COPA heeft men opgemerkt dat het fusiegen product van TMPRSS2 met ERG en ETV1 in de meerderheid van prostaatkanker patiënten voorkomt (> 50%). Het androgeen gevoelige TMPRSS2 is hierbij een prostaat specifiek gen dat codeert voor een proteïne van de serine protease familie. ERG en ETV1 zijn beiden ETS transcriptiefactoren waarvan werd aangetoond dat ze tot overexpressie worden gebracht in prostaatkanker.²⁸⁻³⁰ Uitbreiding van de kwantitatieve PCA3 urinetest (PCA3/GAPDH) met de detectie van producten van dit ETS-TMPRSS2 fusiegen, zou in de toekomst dus kunnen leiden tot het ontstaan van een test met een nog hogere sensitiviteit en specificiteit dan de PCA3 urinetest alleen.

De perfecte test voor de diagnose en screening van prostaatkarcinoom zou een onnodige biopsie in patiënten zonder kanker vermijden, nauwkeurig diegenen met een klinisch significant prostaatkarcinoom diagnosticeren en patiënten met een klinisch niet-significante ziekte uitsluiten. Aangezien deze eigenschappen aangenomen kunnen worden voor onze ontwikkelde PCA3/GAPDH-test op prostaatweefsel, kan deze de diagnose, gesteld door de traditionele immunohistochemische methode, al dan niet bevestigen. Ondanks PCA3-RNA detecteerbaar is in cellen aanwezig in prostaatmassage vocht, suggereert deze studie voor de PCA3/GAPDH-urinetest een mindere efficiëntie dan op prostaatweefsel, doch opvolging van de patiënten opgenomen in deze studie is vereist. Toch belooft deze test in de toekomst een specifieke, niet-invasieve, vroegtijdige diagnose en screening van prostaatkarcinoom. Door de hoge negatief predictieve waarde kan deze test immers gepositioneerd worden voor de diagnostiek van patiënten waarbij een verhoogd PSA gehalte waargenomen werd. In tegenstelling tot PCA3, is uit deze studie echter gebleken dat AMACR een minder toepasselijke biomarker vormt voor de vroegtijdige detectie van prostaatkarcinoom, dit zowel in weefsel als urine.

De resultaten van dit onderzoek tonen dus aan dat onze ontwikkelde PCA3/GAPDH-test een nieuwe efficiënte methode biedt die in aanvulling of zelfs ter vervanging van de histologie, toelaat prostaatkarcinoom op een accurate wijze te diagnosticeren in prostaatweefsel. Verdere klinische evaluatie is nodig om de waarde ervan op prostaatmassage vocht te bevestigen.

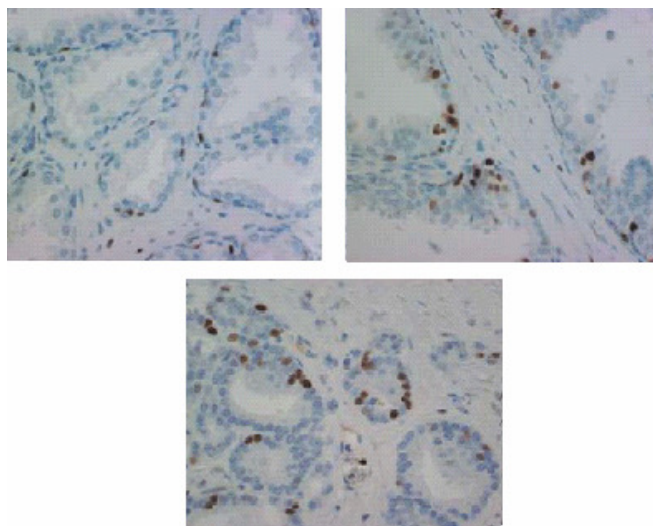
Referenties

1. Epidemiology, Screening, and Biomarkers for Prostate Cancer. PIM, LLC 2006.
2. Crawford DE. Epidemiology of Prostate Cancer. *J.Urol* 2003; 62 (Suppl 6A): 3-12.
3. Chodak G. Prostate Cancer: Epidemiology, Screening, and Biomarkers. *Rev Urol.* 2006; 8(suppl 2): S3-S8.
4. Postma R, Schröder FH. Screening for prostate cancer. *EJC* 2005; 41: 825-833.
5. Nelen V. Epidemiology of prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 175: 1-8.
6. Mambourg F, Van Den Bruel A, Leys M, Vinck I, Devriese S, Lona M, et al. Health Technology Assessment prostate-specific-antigen (PSA) voor prostaatankerscreening. *Federaal Kenniscentrum voor de Gezondheidszorg* 2006; 31A: 1-106.
7. URL: <http://www.urologiebrugge.be/azlink.pdf>
8. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development* 2000; 14: 2410-2434.
9. Padmanabhan V, Callas P, Philips G, Trainer TD en Beatty BG. DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker for proliferation in prostate cancer. *J.Clin.Pathol.* 2004; 57: 1057- 1062.
10. URL: <http://www.tegenkanker.be/rubriek.asp?rubid=56>
11. URL: <http://users.pandora.be/theo.putzeys/CAP/CAP0000.htm>
12. Mistry K, Cable G. *J. Am. Board Fam Pract* 2003; 16: 95-101.
13. Freedland SJ, Partin AW. Detecting Prostate Cancer with Molecular Markers: uPM3. *Rev Urol.* 2005; 7(4): 236-238.
14. De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeneij LA, Aalders TW, et al. DD3^{PCA3}, a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors. *Cancer Research* 2002; 62: 2695-2698.
15. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3^{PCA3}), a highly prostate cancer-specific gene. *J Urol* 2003; 62(Suppl5A): 34-43.
16. Hessels D, Mulders PFA, Karthaus HFM, Witjes JA, Schalken JA. De rol van PCA3^{DD3} in de diagnostiek van prostaatanker. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2005; 30: 32-37.
17. Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HFM, Schalken JA, et al. DD3: A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Research* 1999; 59: 5975-5979.
18. Verhaegh GW, van Bokhoven A, Smit F, Schalken JA, Bussemakers MJG. Isolation and Characterization of the Promoter of the Human Prostate Cancer-specific DD3 Gene. *JBC* 2000; 275(48): 37496-37503.
19. Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ, et al. α -Methylacyl-CoA Racemase: A New Molecular Marker for Prostate Cancer. *Cancer Research* 2002; 62: 2220-2226.
20. Zheng SL, Chang B, Faith DA, Johnson JR, Isaacs SD, Hawkins GA, et al. Sequence Variants of α -Methylacyl-CoA Racemase Are Associated with Prostate Cancer Risk. *Cancer Research* 2002; 62: 6485-6488.

21. Carter HB, Isaacs WB. Improved Biomarkers for Prostate Cancer: A Definite Need. *JNCI* 2004; 96 (11): 813-815.
22. Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Prostate Cancer Using Substraction an Microarry. *Cancer Research* 2000; 60: 1677-1682.
23. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, et al. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; 287 (13): 1662-1670.
24. Jiang Z, Woda BA, Wu CL, Yang XJ. Discovery and clinical application of a novel prostate cancer marker: alpha-methylacyl CoA racemase (P504S). *Am J Clin Pathol* 2004; 122 (2): 275-289.
25. Zielie PJ, Mobley JA, Ebb RG, Jang Z, Blute RD, Ho SM. A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme a racemase in prostatic secretions. *J Urol* 2004; 173 (3): 1130-1132.
26. Zehentner BK, Secrist H, Zhang X, Hayes DC, Ostenson R, Goodman G, et al. Detection of alpha-methylacyl-coenzyme-A racemase transcripts in blood and urine samples of prostate cancer patients. *Mol Diagn Ther* 2006; 10 (6): 397-403.
27. Schmidt U, Fuessel S, Koch R, Baretton GB, Lohse A, Tomasetti S et al. Quantitive Multi-gene Expression Profiling of Primary Prostate Cancer. *The Prostate* 2006; 1521-1534.
28. Ahlers CM, Figg WD. ETS-TMPRSS2 Fusion Gene Products in Prostate Cancer. *Cancer Biology & Therapy* 2006; 5 (3): 254-255.
29. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furasato B, Sun C, Nau M et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 2005; 24 (23): 3847-3852.
30. Saramaki O, Visakorpi T. Chromosomal aberrations in prostate cancer. *Front Biosci* 2007; 1 (12): 3287-3301.

Bijlagen

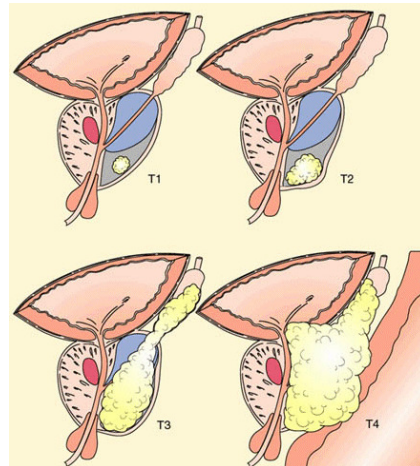
Bijlage 1



Figuur A: MCM7 immunohistochemische kleuring van benigne prostaatweefsel (links boven), PIN (rechts boven) en prostaatcarcinoom weefsel (midden onderaan).⁹

Bovenstaande figuur toont een MCM7-kleuring van benigne prostaatweefsel, PIN en prostaatcarcinoom weefsel. Het minichromosome maintenance proteïne MCM7, essentieel voor DNA replicatie, blijkt een goede proliferatiemarker te zijn, dewelke een beter onderscheid kan aantonen tussen deze drie weefselvormen dan de klassieke Ki-67 staining. Deze marker wordt hierbij predominant aangetoond in basale cellen bij benigne weefsel. Dit in tegenstelling tot PIN en carcinoom weefsel, waarbij de marker voornamelijk wordt aangekleurd in non-basale en epitheliale cellen respectievelijk.⁹

Bijlage 2



Figuur B: TNM-classificatie voor prostaatcarcinomen.¹¹

TNM-classificatie staat toe prostaatcarcinomen in te delen in 4 types. T1 carcinomen omsluit hierbij deze die ontstaan en gelegen zijn in de perifere zone. T2 omvat tumoren die een uitstulping laten aanvoelen bij een rectaal onderzoek. T3- en T4 - tumoren vertonen beiden een aangetast prostaatkapsel. Tevens worden bij T4 nog andere aangetaste structuren aangetroffen, waaronder de zaadblaasjes.¹¹

Bijlage 3

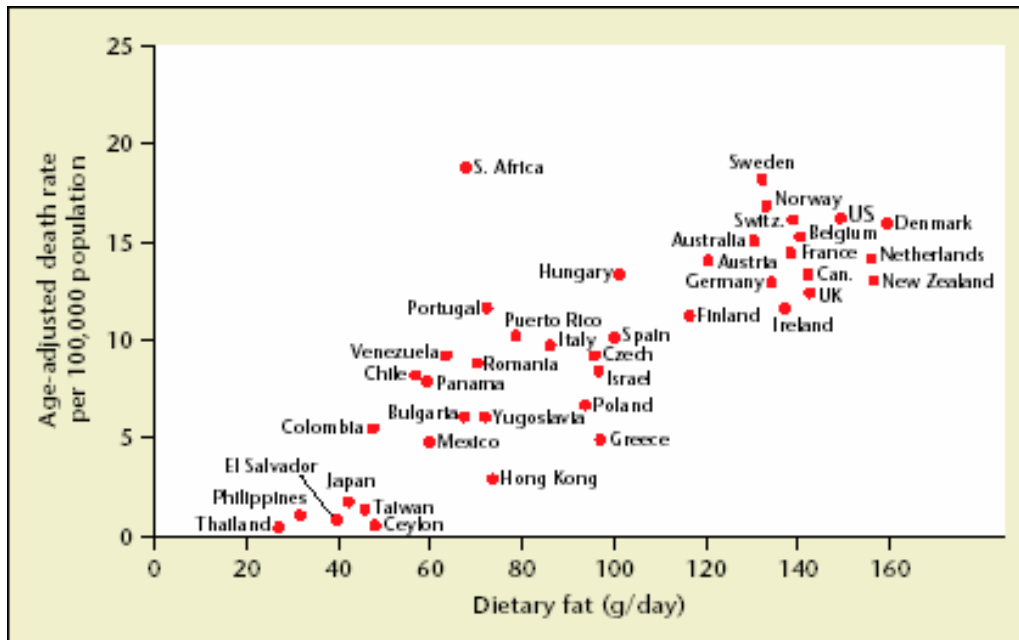
Tabel A: Voorstelling van de verschillende gleasongraden en desbetreffende tumortypes.

Gleasongraad	Tumorernt
1	Vergelijkbaarheid met normaal prostaatweefsel. Zij zijn van minst belang aangezien ze vrij zelden voorkomen en een prognose hebben die slechts lichtjes beter is dan graad 3.
2	
3	Het meest frequente tumortype, gekenmerkt door een goede differentiatie en zeer herkenbare structuren.
4	De belangrijkste graad, omwille van het hoge voorkomen en de merkbaar verslechterde prognose bij aanwezigheid van veel graad 4 tumorweefsel. De normale architectuur van het weefsel is hier veel minder goed bewaard.
5	Geen differentiatie

Gleason-classificatie staat toe prostaatcarcinomen histologisch in 5 types (gleasongraad) onder te verdelen op basis van hun ernst. Aangezien meestal 2 tumor types worden aangetroffen in een prostaatcarcinoom, worden zuivere gleasongraden veeleer niet gebruikt maar wordt een gecombineerde gleasonscore toegekend. De beste score is hierbij 2 (graad1 + graad 1), de slechtste 10 (graad 5+ graad 5). De meest voorkomende scores zijn Gleason 5 (2+3), 6 (3+3) en 7 (4+3).

Algemeen kan worden aangenomen dat hoe hoger de gleasonscore is, des te lager de kans op genezing kan worden verzekerd, en des te lager de kans op een goede prognose bestaat.¹¹

Bijlage 4



Figuur C: Relatie tussen de vetinname vanuit de voeding en mortaliteit ten gevolge van prostaatcancer.³

Bovenstaande figuur visualiseert de lineaire correlatie tussen de gemiddelde inname van vetten, aanwezig in het dieet, en mortaliteit ten gevolge van prostaatcarcinoom. Mortaliteit werd hierbij aangepast voor de leeftijd.

Een oplopend aantal in sterftes kan duidelijk waargenomen worden in westerse landen, waar de gemiddelde hoeveelheid van dierlijke vetten in de voeding hoger is.³

Bijlage 5

Tabel B: Potentiële markers voor het prostaatcarcinoom¹

Marker	Characteristics	Potential Uses
PSMA	Elevated in both primary and metastatic disease	Under evaluation as a target for diagnosis and radioimmunotherapy
GRN-A	Found in the secretory granules of neuroendocrine cells	May be a marker for advanced hormone-refractory disease
GSTP-1	Hypermethylation of this gene or its promoter in its CpG islands	May distinguish PIN from prostate cancer, GSTP-1 expression seems to be independent of PSA expression
PSCA	Expressed primarily in prostate cancer cells	PSCA levels and disease severity appear to correspond; unclear whether it has more utility than PSA levels
AMACR	An enzyme involved in the oxidation of fatty acids; overexpressed in PIN and prostate cancer	Potential use for tissue diagnosis and for stratifying low- and high-risk patients
DD3/PCA-3	A gene that does not appear to code for a protein, but is markedly upregulated in prostate cancer	Potentially better positive and negative predictive values than PSA
IGF	Complex cell signaling molecules involved in regulating growth, cellular proliferation, cellular transformation, and apoptosis	Tissue expression of IGFs and IGFbPs associated with established parameters of disease progression
EPCA	A nuclear matrix protein	Shows a potential to serve as a highly specific blood-based marker for prostate cancer
PCA-1	A new gene that shows increased mRNA expression in cancer tissue	PCA-1 could be a useful diagnostic marker
PIM-1	A gene identified through microarray analysis that is overexpressed in prostate cancer	PIM-1 may play an important role in prostate cancer progression and has potential to be a diagnostic and prognostic marker

GRN-A, chromogranin-A; GSTP-1, glutathione-S-transferase-1.

Tabel B geeft een overzicht weer van een aantal potentiële markers voor prostaatcarcinoom. Deze genen, ontdekt met behulp van micro-array analyse, zouden een prostaatcarcinoom specifieke expressie hebben, waardoor ze een belangrijke waarde kunnen betekenen in de vroegtijdige, niet-invasieve detectie van prostaatkanker.¹

Bijlage 6

Tabel C: Statistische parametrische waarden van de PCA3/GAPDH-test op prostaatweefsel bij alle mogelijke cut-off waarden (TP: test positief; TN: test negatief; FP: vals positief; FN: vals negatief)

PCA3/GAPDH (abnormals above cut-off)	Sensitivity	Specificity	TP	TN	FP	FN
-	100,0%	0,0%	20	0	28	0
0	100,0%	7,1%	20	2	26	0
0,003773189	100,0%	10,7%	20	3	25	0
0,0084023	100,0%	14,3%	20	4	24	0
0,052556026	100,0%	17,9%	20	5	23	0
0,09944206	100,0%	21,4%	20	6	22	0
0,114228931	100,0%	25,0%	20	7	21	0
0,124136562	100,0%	28,6%	20	8	20	0
0,22144188	100,0%	32,1%	20	9	19	0
0,278355405	100,0%	35,7%	20	10	18	0
0,438302861	100,0%	39,3%	20	11	17	0
0,849684999	100,0%	42,9%	20	12	16	0
1	100,0%	46,4%	20	13	15	0
1,505246747	100,0%	50,0%	20	14	14	0
1,815038311	100,0%	53,6%	20	15	13	0
2,549121255	100,0%	57,1%	20	16	12	0
3,317278183	100,0%	60,7%	20	17	11	0
4,155436413	100,0%	64,3%	20	18	10	0
4,272261632	100,0%	67,9%	20	19	9	0
4,438277888	100,0%	71,4%	20	20	8	0
5,540437872	100,0%	75,0%	20	21	7	0
7,862564788	100,0%	78,6%	20	22	6	0
8,426888288	100,0%	82,1%	20	23	5	0
9,18958684	100,0%	85,7%	20	24	4	0
9,18958684	95,0%	85,7%	19	24	4	1
9,713559075	90,0%	85,7%	18	24	4	2
14,12324794	90,0%	89,3%	18	25	3	2
19,29292524	85,0%	89,3%	17	25	3	3
27,6651914	85,0%	92,9%	17	26	2	3
28,74023593	80,0%	92,9%	16	26	2	4
44,7867477	75,0%	92,9%	15	26	2	5
52,70982511	70,0%	92,9%	14	26	2	6
64,4451552	65,0%	92,9%	13	26	2	7
76,90470717	65,0%	96,4%	13	27	1	7
101,8286699	60,0%	96,4%	12	27	1	8
137,1870032	55,0%	96,4%	11	27	1	9
160,3410481	55,0%	100,0%	11	28	0	9
160,3410481	50,0%	100,0%	10	28	0	10
1180,350819	45,0%	100,0%	9	28	0	11
1265,068684	40,0%	100,0%	8	28	0	12
2530,137369	35,0%	100,0%	7	28	0	13
3304,004646	30,0%	100,0%	6	28	0	14
4329,545894	25,0%	100,0%	5	28	0	15
5614,726369	20,0%	100,0%	4	28	0	16
6936,537599	15,0%	100,0%	3	28	0	17
10660,59248	10,0%	100,0%	2	28	0	18
24238,28495	5,0%	100,0%	1	28	0	19
51063,32989	0,0%	100,0%	0	28	0	20

Bijlage 7

Tabel D: Statistische parametrische waarden van de PCA3/GAPDH-test op prostaatmassage vocht bij alle mogelijke cut-off waarden (TP: test positief; TN: test negatief; FP: vals positief; FN: vals negatief)

PCA3/GAPDH (abnormals above cut-off)	Sensitivity	Specificity	TP	TN	FP	FN
-	100,0%	0,0%	6	0	29	0
0,00	100,0%	27,6%	6	8	21	0
0,03	100,0%	31,0%	6	9	20	0
0,10	100,0%	34,5%	6	10	19	0
0,44	83,3%	34,5%	5	10	19	1
0,46	83,3%	37,9%	5	11	18	1
0,49	83,3%	41,4%	5	12	17	1
0,70	83,3%	44,8%	5	13	16	1
1,00	83,3%	48,3%	5	14	15	1
1,14	83,3%	51,7%	5	15	14	1
1,33	83,3%	55,2%	5	16	13	1
1,74	83,3%	58,6%	5	17	12	1
2,03	83,3%	62,1%	5	18	11	1
2,21	83,3%	65,5%	5	19	10	1
2,23	83,3%	69,0%	5	20	9	1
2,86	66,7%	69,0%	4	20	9	2
3,99	66,7%	72,4%	4	21	8	2
4,72	50,0%	72,4%	3	21	8	3
4,87	33,3%	72,4%	2	21	8	4
10,89	33,3%	75,9%	2	22	7	4
11,08	33,3%	79,3%	2	23	6	4
23,59	33,3%	82,8%	2	24	5	4
24,00	16,7%	82,8%	1	24	5	5
26,91	16,7%	86,2%	1	25	4	5
36,00	16,7%	89,7%	1	26	3	5
39,95	16,7%	93,1%	1	27	2	5
72,00	16,7%	96,6%	1	28	1	5
109,14	16,7%	100,0%	1	29	0	5
229,90	0,0%	100,0%	0	29	0	6

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

PCA3-RNA kwantificatie: een moleculair genetische test voor de vroegtijdige diagnose van prostaatcarcinoom

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

Kimy Emonds

Datum: **18.06.2007**