

<http://hdl.handle.net/1765/115842>



Samenvatting



Prostaatkanker (PK) is de op twee na meest voorkomende maligniteit onder mannen. Jaarlijks krijgen 11.700 mannen in Nederland deze diagnose, waarvan ongeveer 2.800 hieraan uiteindelijk overlijden. Huidige markers voor het opsporen van de ziekte, zoals bijvoorbeeld PSA, hebben een goede sensitiviteit, maar hebben te weinig specificiteit. Hierdoor krijgen te veel mannen onnodig de diagnose en bestaat er een kans op overbehandeling. Hierdoor zijn er nieuwe markers nodig die beter in staat zijn om de diagnose te stellen en prognose te bepalen.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie weer en bespreekt de doelstelling van dit proefschrift. Verder geeft dit hoofdstuk uitleg over wat een marker precies is en welke types er zijn. Ook de bron van deze marker (urine of bloed) wordt bediscussieerd. Stappen in de ontwikkeling van een marker naar de kliniek worden uiteengezet.

Wanneer men zoekt naar een nieuwe marker voor PK, is het belangrijk om te weten welke er al zijn beschreven in de literatuur. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van alle markers voor PK die tot dat moment bekend waren. In dit hoofdstuk wordt naast PSA (inclusief varianten en karakteristieken) en andere beschreven markers, blaasjes ofwel 'extracellular vesicles' (EVs) geïntroduceerd.

Wereldwijd zijn er veel onderzoeksgroepen die zich richten op het ontdekken van nieuwe markers voor PK. Ondanks de vooruitgang omtrent technische ontwikkelingen, blijft het ontdekken van deze markers uit bloed of urine een uitdaging. Een van de voornaamste problemen is het zogenaamde 'dynamic range problem'. In urine en bloed zitten veel verschillende eiwitten en RNAs in sterk verschillende concentraties. De meest interessante markers zijn waarschijnlijk in een zeer lage concentratie aanwezig. Hierdoor worden ze overschaduwed door de veel voorkomende eiwitten/RNAs en kan men deze interessante markers lastig identificeren. Het is net als zoeken naar een 'naald in een hooiberg'. Eén van de oplossingen zou het onderzoeken van EVs kunnen zijn.

Hoofdstuk 3 geeft een overzicht van alle publicatie omtrent EVs, inclusief biogenese, functie en inhoud in relatie tot PK. Hoe EVs gemaakt worden is nog niet helemaal duidelijk, maar wel weten we dat ze worden gemaakt in zogenaamde 'multi-vesicular bodies (MVB)'. Nadat deze MVB op gaat in het celmembraan, komen de EVs vrij. Buiten de cel hebben ze allerlei functies, voornamelijk in het afweersysteem. Door het presenteren van antilichamen kunnen ze interactie hebben met de ontvangende cel. Daarnaast kunnen ze eiwitten en RNA transporteren van de ene naar de andere cel. Binnen de oncologie is de rol van EVs nog onduidelijk waarbij ze soms pro- of antitumor effecten hebben. De belangrijkste technieken voor isolatie zijn ultracentrifugatie, precipitatie en via immuunaffiniteit. Het aantal publicaties over EVs en PK zijn beperkt, echter sommige hebben al kandidaat markers gevonden voor deze ziekte. Ook al neemt het aantal publicaties over dit specifieke onderwerp toe, er is meer onderzoek nodig om de klinische waarde van EVs beter te bepalen.

Omdat EVs door hun biogenese een weergave zijn van de cel waarvan ze afkomstig zijn, zou het in kaart brengen van hun inhoud kunnen leiden tot het vinden van nieuwe markers. In **hoofdstuk 4** hebben we eiwitten in EVs onderzocht. In samenwerking met het Environmental Molecular Science Laboratory (EMSL) in Richland, WA, USA, hebben we EVs geanalyseerd van twee prostaat epitheel cellijnen (PNT2C2 en RWPE-1) en twee PK-cellijnen (PC346C en VCaP) door een nanoLC-LC-LTQ-Orbitrap massaspectrometer te gebruiken. Met deze techniek hebben we 52 eiwitten gevonden die verschillend tot expressie kwamen, waarvan er negen hoger tot expressie kwamen in PK EVs. Van deze lijst werden drie kandidaat markers geselecteerd (FASN, XPO1 en PDCC6IP). Validatie met behulp van Western blotting bevestigde de hogere expressie in EVs afkomstig van PK. Wanneer we deze markers valideerden middels immunohistochemie viel het op dat wanneer de Gleason score omhoogging, de expressie van XPO1 zich van de kern verplaatste naar het cytoplasma. Dit gaf het idee dat translocatie van XPO1 geassocieerd zou kunnen zijn aan een slechtere klinische uitkomst.

Zoals beschreven in de introductie, moet men om de vertaling te maken van ontdekking naar een klinisch toepasbare marker, deze getest worden op patiëntmateriaal. **Hoofdstuk 5** beschrijft de studie waarin we de drie eerder ontdekte kandidaat markers (FASN, XPO1 en PDCC6IP) hebben gevalideerd op materiaal van twee onafhankelijke grote groepen patiënten. In eerste instantie hebben we eiwitfracties van weefsel (na RNA-isolatie) genomen van 67 patiënten (33 gezonde mannen en 34 PK-patiënten) en deze geanalyseerd met een nano-LC massaspectrometer. In deze studie liet alleen XPO1 een hogere expressie zien in PK ($p > 0.0001$). Hierna hebben we dezelfde markers immunohistochemisch getest in een 'tissue microarray' (TMA) die weefsel bevatte van 481 patiënten na radicale prostatectomie. Wanneer we de expressie vergeleken met meerdere klinische en pathologische uitkomsten was alleen XPO1 in cytoplasma gecorreleerd aan een hoge Gleason score ($p = 0.002$) en aan PK-gerelateerd overlijden ($p = 0.009$). Met deze studie hebben we laten zien dat XPO1 een interessante marker is voor PK.

In **hoofdstuk 6** hebben we dezelfde klinische validatie sets gebruikt als in hoofdstuk 5 om zo eiwitten, betrokken binnen het 'Arachidonic acid pathway', te valideren ten aanzien van een biochemisch recidief na radicale prostatectomie. In totaal werden 798 eiwitten gevonden die statistisch significant verschilden tussen gezond weefsel en PK. Uit deze lijst werden vier eiwitten gekozen die verhoogd tot expressie kwamen in PK (AGR2, FASN, LX15B en LOX5). Immunohistochemie toonde dat AGR2, LOX5 en LX15B positief waren in PK en negatief/laag positief in normaal weefsel. FASN kwam hoger tot expressie wanneer de Gleason score toename. Wanneer deze markers werden getest op de TMA, was AGR2 gecorreleerd aan een hogere Gleason score ($p = 0.032$). LOX5 expressie in het cytoplasma bleek geassocieerd aan een hogere klinisch pT-stadium ($p = 0.044$). FASN liet geen relatie zien met klinische of pathologische parameters. Kaplan-Meier analyse

toonde dat een laag percentage met positieve tumorcellen (<100%) voor AGR2 (HR (95% CI) = 0.61 (0.43-0.93) en ook aanwezige LOX5 expressie (HR (95% CI) = 2.53 (1.23-5.22) voorspellers waren voor een biochemisch recidief na radicale prostatectomie.

Kwantificatie van EVs en het karakteriseren op het niveau van een enkel blaasje blijft zelfs met nieuwe ontwikkelingen, zeer uitdagend. De meeste technieken die nu worden toegepast zijn tijdsintensief en beperkt in hun efficiëntie/behoudt van integriteit van de EVs. Om weefselspecifieke EVs uit urine of bloed te meten, moeten nieuwe en betere assays ontwikkeld worden. Een interessante techniek waarmee isolatie en karakterisatie in één assay gecombineerd zou kunnen worden is een (sandwich)-immuunaffiniteits assay gericht tegen transmembraameiwitten die tot expressie komen op EVs. In **hoofdstuk 7** beschrijven we de ontwikkeling en validatie van een hoog-sensitieve TR-FIA ('time resolved fluorescence immunoassay') tegen de transmembraameiwitten CD9 en CD63. Kweekmedium van 37 verschillende cellijnen en urine van PK-patiënten (n=67), mannen zonder PK (n=76). Ter controle namen we urine van mannen na een radicale prostatectomie (n=13), vrouwen (n=16) en patiënten met PK, maar dan zonder prostaatmassage (n=16). Na optimalisatie toonde we aan dat deze assay met een hoge sensitiviteit en een zeer laag achtergrondsignaal, EVs kon meten. De expressie van CD9 en CD63 varieerde enorm tussen de verschillende cellijnen. In de klinische samples was de expressie van CD9 en CD63 hoger in urine van PK-patiënten (na correctie voor PSA in de urine). Meer PK-specifieke moeten in deze assay getest worden om zo de meest ideale combinatie voor diagnose en prognose voor PK te bepalen.

In dit proefschrift hebben we laten zien dat EVs, vanwege hun biogenese, een interessante bron zijn voor het zoeken naar nieuwe markers voor PK. Het in kaart brengen van PK EVs heeft geleid tot de identificatie van meerdere kandidaat markers, waarvan XPO1 en CD63/PSA overbleven na validatie op klinische patiënt weefsel. Meer onderzoek is nodig om de exacte klinische toepasbaarheid van deze marker vast te stellen. Omdat huidige technieken voor het isoleren en karakteriseren van EVs tijdsintensief zijn en niet in staat zijn om grote hoeveelheden samples te verwerken, moeten nieuwe technieken ontwikkeld worden. Wij hebben succesvol een zeer sensitieve TR-FIA ontwikkeld die in staat was om EVs te meten en onderscheid te maken tussen PK en gezonde mannen. Meer PK-specifieke antilichamen moeten in deze assay getest worden om een nog betrouwbaardere diagnose te stellen en de prognose beter te voorspellen. Met deze assay zouden EVs in de toekomst gebruikt kunnen worden als marker voor diagnostiek, prognose en ziekte beloop.