

De rol van PCA3^{DD3} in de diagnostiek van prostaatkanker

D. HESSELS¹, P.F.A. MULDER², H.F.M. KARTHAUS³, J.A. WITJES² en J.A. SCHALKEN¹

Prostaatkanker is een ziekte die vaak in een laat stadium ontdekt wordt. Omdat er momenteel geen adequate behandelingsmethoden zijn voor patiënten die gediagnosticeerd worden met gemetastaseerd prostaatcarcinoom, is het belangrijk de ziekte in een vroeg stadium te ontdekken. De gangbare methode om prostaatkanker op te sporen is een bloedonderzoek op PSA. Deze test heeft een geringe specificiteit, waardoor de PSA-geïndiceerde TRUS-geleide prostaatpuncties in 70-80% van de mannen met een verhoogde serum-PSA-waarde een negatief resultaat opleveren. Om het aantal negatieve bipten te kunnen reduceren wordt er naarstig gezocht naar een test die prostaatkanker goed aantoonst én uitsluit. De recent ontwikkelde PCA3^{DD3}-test lijkt een duidelijk toegevoegde waarde te hebben; het is in feite de eerste test voor het opsporen van kanker die gebaseerd is op de moleculaire DNA/RNA-technologie. Dit artikel is bedoeld om deze urinetest onder de aandacht te brengen van klinici. Zij zijn immers bepalend voor een succesvolle klinische toepassing van deze nieuwe urinetest.

Trefwoorden: PCA3^{DD3}; moleculaire diagnostiek; prostaatkanker; kwantitatieve RT-PCR; urine-PCA3^{DD3}-test

Onder de westerse mannelijke populatie is prostaatkanker uitgegroeid tot een belangrijk gezondheidsprobleem. In veel ontwikkelde landen is het niet alleen de meest gediagnosticeerde kwaadaardige aandoening bij mannen, maar is het tevens de tweede aan kanker gerelateerde doodsoorzaak. Omdat de incidentie van prostaatkanker toeneemt met de leeftijd, zullen er meer mannen gediagnosticeerd worden met deze aandoening naarmate de levensverwachting toeneemt. In de Verenigde Staten van Amerika en in Europa wordt het aantal nieuwe patiënten met prostaatkanker geschat op respectievelijk 230.000 en 85.000 per jaar (1, 2). Epidemiologische studies hebben aangetoond dat prostaatkanker vaak een indolente aandoening is, en dat er meer mannen zullen sterven met

prostaatkanker dan aan deze kwaadaardige aandoening. Echter 25 tot 30% van de tumoren vertoont een agressief karakter en dit heeft tot gevolg dat er jaarlijks ~29.900 Amerikanen en ~35.000 Europeanen ten gevolge van prostaatkanker komen te overlijden. Dit hoge sterftecijfer wordt veroorzaakt doordat er momenteel geen adequate therapeutische behandeling is voor gemetastaseerde vormen van prostaatkanker. Voor behandeling hiervan wordt er gebruikgemaakt van het remmen van androgeen-gemedieerde groei, bijv. LHRH-agonisten en/of perifere anti-androgenen. In eerste instantie reageert 70-80% van de patiënten goed op de behandeling. Echter, binnen 2 tot 3 jaar na aanvang van de therapie zal de meerderheid van de tumoren androgeen-onafhankelijk worden en een meer agressief karakter tonen. Dit heeft tot gevolg dat de meeste patiënten progressie van hun ziekte zullen vertonen. Ook voor deze androgeen-ongevoelige tumoren bestaat er geen effectieve behandeling. Meer dan 70% van de patiënten met androgeen-ongevoelige tumoren lijdt onder de pijnlijke botmetastasen voordat zij bezwijken aan hun ziekte.

Radicale prostatectomie en radiotherapie zijn curatieve therapeutische opties voor prostaatkanker, maar zijn alleen curatief indien de aandoening beperkt is tot de prostaat. Vroegtijdige detectie van prostaatkanker is daarom van cruciaal belang. Meer dan 20 jaar geleden werd prostaatspecifiek antigeen (PSA) ontdekt en het is sindsdien het meest waardevolle instrument gebleken in de detectie, stadiëring en het monitoren van prostaatkanker. Sinds 1997 heeft de European Randomized Study of Screening (ERSPC) serum-PSA-waarden ≥ 3 ng/ml geaccepteerd als indicatie voor het nemen van prostaatpuncties in de screeningsarm, en digital rectal examination (DRE) en transrectaal ultrasound (TRUS) zijn van de hand gedaan als initiële screentest voor prostaatkanker (3, 4). Een grote studie heeft aangetoond dat ongeveer 50% van de patiënten met PSA-waarden >10 ng/ml prostaatkanker in een gevorderd stadium heeft. Bij het merendeel van de patiënten met serum-PSA-waarden <10 ng/ml is de aandoening beperkt tot de prostaat (5). Deze bevindingen hebben geleid tot de conclusie, dat bij de meeste mannen met serum-PSA-waarden tussen 3 en 10 ng/ml de aandoening beperkt is tot de prostaat en dat deze mannen kunnen profiteren van een curatieve behandeling.

Hoewel PSA wereldwijd geaccepteerd is als een prostaattumormarker, blijkt PSA weliswaar orgaan-specifiek maar niet prostaatkankerspecifiek te zijn. Serum-PSA-waarden zijn immers ook verhoogd in

Experimentele Urologie, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, UMC St Radboud, Nijmegen¹; Afdeling Urologie, UMC St Radboud, Nijmegen²; Afdeling Urologie, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen³

Correspondentie: Prof. dr. J.A. Schalken, Experimentele Urologie, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
E-mail: J.Schalken@uro.umcn.nl

mannen met BPH en prostatitis. Deze aanzienlijke overlap van serum-PSA-waarden in mannen met niet-maligne prostaataandoeningen en prostaatkanker is de voornaamste beperking van serum-PSA als een prostaattumormarker. Bovendien kan serum-PSA niet worden gebruikt om onderscheid te maken tussen de tumoren die latent blijven en tumoren die een meer agressief karakter zullen tonen. Na het constateren van een verhoogd serum-PSA ≥ 3 ng/ml volgen de gebruikelijke zes TRUS-geleide puncties. De lage specificiteit van PSA leidt echter in 70-80% van de gevallen tot een negatieve sextant-biopt. In sommige gevallen kunnen de puncties niet representatief zijn, waardoor er een aantal tumoren kan worden gemist. De meeste academische centra adviseren dan ook het aantal puncties uit te breiden naar tien. In het geval dat de PSA verhoogd blijft, zullen er nieuwe puncties worden genomen, waarbij dan in 10-20% alsnog prostaatkanker aangetoond wordt (6). Omdat er kans op bloedvergiftiging bestaat, krijgt de patiënt een antibioticakuur. Al met al een zeer onplezierig onderzoek, dat 80% van de mannen alleen maar ondergaat om uiteindelijk vast te stellen dat het loos alarm is geweest.

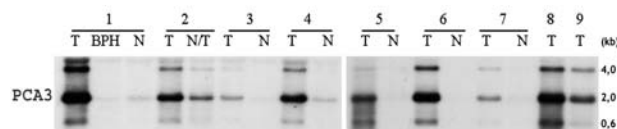
Prostaatkanker-specifieke genen

Momenteel is er grote vraag naar een niet-invasieve diagnostische test, die de uroloog in staat stelt prostaatkanker in een vroeg stadium te detecteren én uit te sluiten, zodat het aantal mannen met een negatief sextant-biopt kan worden gereduceerd. De recente ontdekking van genen die niet alleen prostaatspecifiek zijn, maar die ook tot overexpressie komen in prostaattumoren, blijkt dan ook van bijzonder belang voor de ontwikkeling van nieuwe diagnostische toepassingen. Zo is gebleken, dat overexpressie van prostaatspecifiek membraanantigeen (PSMA) correleert met een slechte prognose en in het bijzonder met agressieve gemetastaseerde ziekte (7). In prostaattumoren is overexpressie van NKX3.1, een androgeen-gereguleerd homeobox-gen, aangetoond (8). Een toename in de expressie van prostaatstamcel-antigeen (PSCA) correleert met een hogere Gleason-graad en botmetastasen (9). Expressie van prostaattumor-inducerend gen-1 (PTI-1) is gevonden in prostaattumoren, maar is afwezig in normaal prostaatweefsel of BPH-weefsel (10). Ook is overexpressie van PCGEM-1 significant geassocieerd met prostaatkanker (11). Andere prostaatspecifieke genen zijn PDEF (12), TMPRSS2 (13) en prostase (14). Tot op heden is er niets beschreven over de diagnose van prostaatkanker d.m.v. de expressie van de hiergenoemde genen.

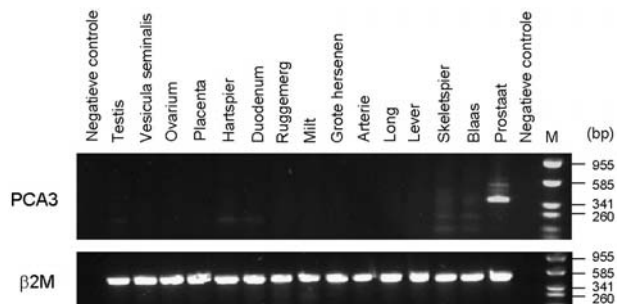
PCA3^{DD3}

Een nieuw prostaatkanker-specifiek gen, PCA3^{DD3}, kan een belangrijke basis vormen voor de diagnose van prostaatkanker. DD3 is een afkorting voor 'differential display code 3', dat verwijst naar één van de beschikbare methoden voor de identificatie van genen die verschillend tot expressie komen. In overeenstemming met de huidige humane genoomnomenclatuur (HUGO) is de naam van het gen veranderd in prostaatkanker-antigeen 3 (PCA3), om de associatie

van dit gen met prostaatkanker te benadrukken. PCA3^{DD3} heeft eigenschappen die een eventuele waardevolle rol in de vroegtijdige detectie van maligne prostaatepitheelcellen ondersteunen. PCA3^{DD3} is sterk verhoogd in maligne prostaatkankercellen en komt in meer dan 95% van de prostaattumoren tot overexpressie. Onze onderzoeksgroep heeft door middel van Northern-blot-analyse aangetoond dat PCA3^{DD3}-messenger-RNA (mRNA) niet tot nauwelijks tot expressie komt in normaal prostaatweefsel en BPH-weefsel afkomstig van dezelfde patiënt. Daarentegen werd er in 53 van de 56 klinische monsters, die waren verkregen van humane radicale prostatectomiepreparaten, overexpressie van PCA3^{DD3} mRNA-transcripten aangetoond. De expressie van PCA3^{DD3}-mRNA in deze prostaattumoren was 10 tot 100-voudig hoger ten opzichte van de PCA3^{DD3}-mRNA-expressie gemeten in het aangrenzende normale prostaatweefsel (15). In figuur 1 is een klassiek voorbeeld van een Northern-blot-analyse te zien, dat duidelijk de verhoogde PCA3^{DD3}-mRNA-expressie in prostaattumoren weergeeft. Dat PCA3^{DD3} daadwerkelijk een prostaatspecifieke expressie heeft, kon worden aangetoond met 'reverse transcriptase'-polymerase-kettingreactie (RT-PCR). Deze techniek is vele malen gevoeliger dan Northern-blot-analyse, en hierdoor kon PCA3^{DD3}-mRNA-expressie in normaal prostaatweefsel en BPH-weefsel worden aangetoond. RT-PCR kon geen PCA3^{DD3}-mRNA-expressie aantonen in een reeks monsters van normale humane weefsels waaronder borst, blaas, lever, long, testis en skeletspier (figuur 2). Tevens kon er geen PCA3^{DD3}-mRNA-expressie worden aangetoond in borsttumoren, baarmoederhalstumoren, ovariumtumoren, en testistumoren



Figuur 1. Met Northern-blot-analyse kan de verhoogde expressie van PCA3^{DD3}-mRNA in prostaattumoren (T) ten opzichte van normaal prostaatweefsel (N) en BPH-weefsel worden aangetoond. Dit is een voorbeeld van een Northern-blot-analyse die overexpressie van PCA3^{DD3}-mRNA in prostaattumoren van 9 (1 t/m 9) patiënten laat zien. PCA3^{DD3} komt in meer dan 95% van de prostaattumoren tot overexpressie.



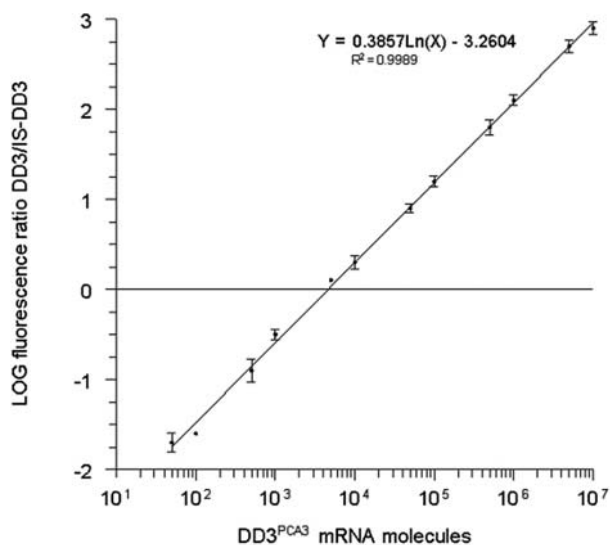
Figuur 2. Met RT-PCR-analyse voor PCA3^{DD3} op normaal hu- man weefsel kan worden aangetoond dat PCA3^{DD3} alleen tot expressie komt in prostaatweefsel. Om aan te tonen dat de hoeveelheid RNA in elke reactie hetzelfde is wordt er gebruik- gemaakt van de expressie van beta2-microglobuline ($\beta 2M$).

(15). PCA3^{DD3}-mRNA-expressie kon worden aangetoond in slechts twee prostaatkankercellijnen, die wereldwijd bekend staan onder de naam LNCaP en 22Rv1.

Onderzoek aan de transcriptie-unit van PCA3^{DD3} heeft aangetoond, dat het gen uit 4 exonen bestaat. Deze kunnen tot een aantal, in grootte verschillende, mRNA-transcripten leiden. Van alle geanalyseerde transcripten is het mRNA-transcript bestaande uit de exonen 1 en 3 en een gedeelte van exon 4 het meest voorkomende. Echter, gedetailleerde analyse van het eiwitcoderend potentieel van het PCA3^{DD3}-mRNA-transcript laat een ongewoon aantal stopcodons zien (15). Normaal gesproken zal een gen dat voor een eiwit codeert één lang open 'reading frame' hebben, dat begint bij een startcodon en eindigt bij een stopcodon. Juist dit lange open 'reading frame' zal worden gebruikt voor de expressie van een eiwit. De aanwezigheid van meerdere stopcodons in de verschillende PCA3^{DD3}-mRNA-transcripten, en het ontbreken van een lang open 'reading frame', doen vermoeden dat het gen niet codeert voor een eiwit. Na een jarenlange vergeefse speurtocht naar de mogelijke (kleine) eiwitten die vertaald zouden kunnen worden van de kleine open 'reading frames' en verdere computeranalyses is het nu duidelijk geworden, dat PCA3^{DD3} een niet-coderend mRNA is en als zodanig functioneert.

PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR

De overexpressie van PCA3^{DD3}-mRNA in kwaadaardige gezwellen van de prostaat biedt de mogelijkheid voor het ontwikkelen van een diagnostische test voor deze ziekte. Echter, PCA3^{DD3} codeert niet voor een eiwit, en dus is het niet mogelijk een klinisch toepasbare eiwit-antilichaam-gebaseerde test te ontwikkelen. Onze onderzoeksgroep heeft een RNA-gebaseerde amplificatiemethode gebruikt om kwantitatief, d.m.v. een combinatie van RT-PCR met een tweevoudige 'time-resolved'-fluorescentie, de hoeveelheid PCA3^{DD3}-mRNA-transcripten te bepalen (16). Deze

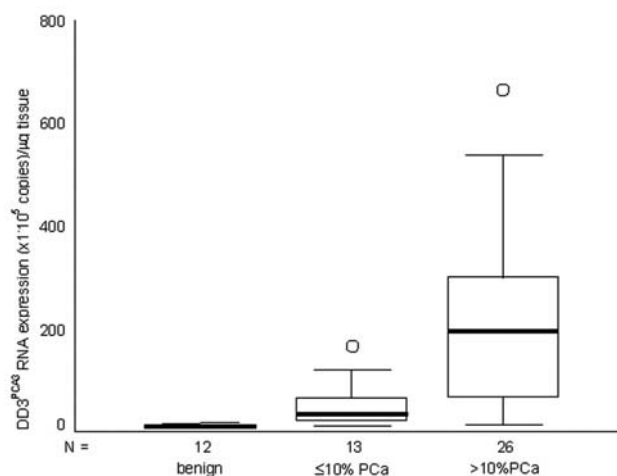


Figuur 3. Een typisch voorbeeld van een externe standaardcurve van de op PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse. Vier onafhankelijke standaardcurven en hun variatiecoëfficiënten zijn in deze curve samengevoegd.

methode heeft een hoge sensitiviteit voor de detectie van PCA3^{DD3}-mRNA-transcripten en maakt het mogelijk het aantal PCA3^{DD3}-mRNA-transcripten in een monster te kwantificeren. Figuur 3 toont een typische standaardcurve, die gebruikt wordt voor de kwantificering van PCA3^{DD3}-mRNA. Het aantal PCA3^{DD3}-mRNA-kopieën is uitgezet tegen de ratio van fluorescentiesignalen van PCA3^{DD3} over zijn interne standaard. Deze techniek heeft een gevoeligheid van 50 kopieën en heeft een dynamisch bereik tot 10 miljoen kopieën.

Deze PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse wordt gebruikt om de bruikbaarheid van PCA3^{DD3} als diagnostische marker voor prostaatkanker te onderzoeken. Hiervoor werd PCA3^{DD3}-mRNA-expressie geanalyseerd in BPH-weefsel, normaal prostaatweefsel, prostaatweefselmonsters met minder dan 10% tumorcellen en met meer dan 10% tumorcellen. Er bleek geen verschil te zijn in PCA3^{DD3}-mRNA-expressie tussen normaal prostaatweefsel en BPH-weefsel. In zeven humane radicale prostatectomiepreparaten werd de PCA3^{DD3}-RNA-expressie in de kwaadaardige processen vergeleken met de PCA3^{DD3}-mRNA-expressie in het niet-maligne prostaatweefsel afkomstig van dezelfde patiënt. Deze op PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse liet zien, dat de PCA3^{DD3}-mRNA-expressie in deze prostaattumoren 6 tot 1500-maal hoger was dan die in het niet-maligne prostaatweefsel (16). In monsters waarin meer dan 10% kankercellen aanwezig waren, was de mediane expressie van PCA3^{DD3}-mRNA 66 maal hoger dan die in de niet-maligne controlegroep (figuur 4). Deze data zijn in overeenstemming met de data verkregen d.m.v. Northern-blot-analyse, waarbij de PCA3^{DD3}-mRNA-expressie 10 tot 100 maal hoger lag in prostaattumoren t.o.v. niet-maligne prostaatweefsels (15).

In prostaattumoren met minder dan 10% kankercellen was de mediane expressie van PCA3^{DD3}-mRNA 11 maal hoger dan in de controlegroep (figuur 4) (16).



Figuur 4. De op PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse toont duidelijke verschillen in expressie. In prostaatweefsel met meer en minder dan 10% tumorcellen is de mediane PCA3^{DD3}-expressie resp. 66-voudig en 11-voudig hoger t.o.v. normaal prostaatweefsel.

Dit voorbeeld laat zien, dat slechts enkele maligne epitheelcellen in een overwegend goedaardig stukje weefsel resulteren in een positief PCA3^{DD3}-testresultaat. Deze op PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse blijkt zo gevoelig, dat hij in staat is slechts enkele tumorcellen in een achtergrond van niet-maligne cellen te detecteren zonder toepassing van microdissectie. Figuur 5 toont de 'receiver operating characteristic'(ROC)-curve voor deze assay uitgevoerd op normaal prostaatweefsel en prostaattumoren, en laat zien dat PCA3^{DD3} zeer goed de prostaattumoren van normaal prostaatweefsel kan onderscheiden. Deze data en het feit dat PCA3^{DD3} niet tot expressie komt in leukocyten, die vaak aanwezig zijn in lichaamsvloeistoffen, indiceren dat deze PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse een veelbelovend diagnostisch instrument kan zijn. Als zodanig zou het kunnen worden gebruikt voor de detectie van maligne prostaatcellen in bloed, urine of ejaculaten die verkregen zijn van patiënten, bij wie de verdenking op de aanwezigheid van prostaatkanker bestaat.

PCA3^{DD3}-gebaseerde urinetest

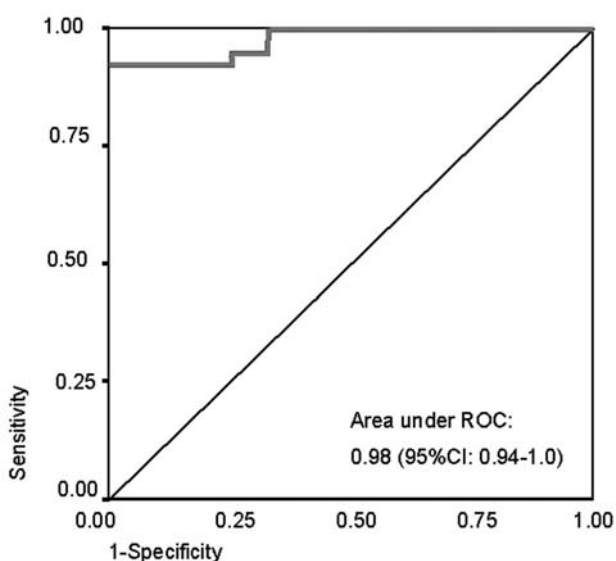
Om deze hypothese te testen werden de PCA3^{DD3}-mRNA-transcripten gekwantificeerd in urinesedimenten, die waren verkregen na uitgebreid rectaal toucher. Door de manipulatie van de prostaat kunnen eventueel aanwezige kankercellen gemobiliseerd worden in de prostaatklierbuizen, om vervolgens in de urethra prostatica terecht te komen. De eerste portie urine bevat de hoogste concentratie afscheidingsproducten van zowel blaas als prostaat. Daarom bevatten de verkregen urinesedimenten naast eventuele prostaatkankercellen ook normale prostaatcellen en urotheelcellen. PSA-mRNA wordt gebruikt om de test te normaliseren voor het aantal prostaatcellen dat

aanwezig is in een urinesediment. Het is bekend dat de PSA-mRNA-expressie relatief constant is in normale prostaatcellen en dat in prostaatkankercellen er slechts een zwakke (~1,5-voudige) verlaging van PSA-mRNA-expressie optreedt (17). Omdat de expressie van PCA3^{DD3}-mRNA 66-voudig toeneemt en de PSA-mRNA-expressie afneemt, zal in tumoren de PCA3^{DD3}/PSA-ratio toenemen.

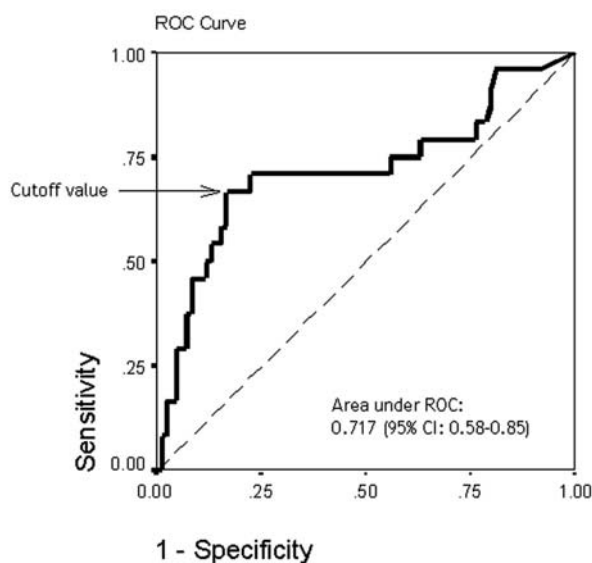
De PCA3^{DD3}/PSA-ratio werd vervolgens gebruikt als diagnostisch instrument voor de accurate detectie van prostaatkankercellen in urinesedimenten verkregen na uitgebreid rectaal toucher. Hiervoor zijn urinesedimenten getest van 108 mannen, die op basis van hun verhoogd serum-PSA (>3 ng/ml) in aanmerking kwamen voor prostaatpuncties. Na uitgebreid rectaal toucher werd de eerste urine verzameld en werden zowel de PCA3^{DD3}- als PSA-mRNA-transcripten in het verkregen sediment gekwantificeerd. De histologie van prostaatpuncties werd als de zogenaamde 'gouden standaard' gebruikt voor de aanwezigheid van prostaatkanker. Van de 108 mannen werd er bij 24 prostaatkanker m.b.v de biopsie aangetoond en werd in de overige 84 mannen geen aanwijzing voor maligniteit gevonden (16).

Om de diagnostische doeltreffendheid van de PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse in urinesedimenten te bepalen, werden de data geprojecteerd in een ROC-curve (figuur 6). Een ROC-curve kan worden gebruikt voor de optimalisatie van een grenswaarde om een positieve test van een negatieve test te onderscheiden. D.m.v. deze ROC-curve werd de grenswaarde van 200×10^{-3} bepaald (16). Volgens deze ROC-curve zouden hogere grenswaarden de gevoeligheid niet doen toenemen en slechts resulteren in een verlies van specificiteit.

Veertien van de 84 mannen met voor prostaatkanker negatieve puncties hadden hogere PCA3^{DD3}/PSA-



Figuur 5. De 'receiver operating characteristic'(ROC)-curve voor de PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse uitgevoerd op normaal prostaatweefsel en prostaattumoren. De hoge 'area under the curve' (AUC) toont aan dat PCA3^{DD3} zeer goed in staat is prostaattumoren van normaal prostaatweefsel te onderscheiden.



Figuur 6. Deze ROC-curve toont de diagnostische doeltreffendheid van de urine PCA3^{DD3}-test. Gebaseerd op deze ROC-curve werd er een grenswaarde van 200×10^{-3} bepaald. Hogere grenswaarden zullen de gevoeligheid van deze test niet doen toenemen, maar zullen slechts leiden tot verlies van specificiteit.

ratio's dan deze grenswaarde. Hierdoor is de specificiteit van deze PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse 83%. In een aanzienlijk aantal gevallen wordt een aanwezige maligniteit gemist in de eerste serie bipten, i.e. bij herhaling van puncties in initieel negatieve patiënten wordt alsnog bij 10-20% kanker aangetoond in een latere sessie van prostaatpuncties. Voor een nauwkeurige bepaling van de positief voorspellende waarde van de PCA3^{DD3}-test is follow-up van de mannen met een fout positieve uitslag van groot belang. Dit zou kunnen bevestigen dat de positieve PCA3^{DD3}/PSA-ratio's voorafgaan aan de histologische detectie van prostaatkanker. Deze follow-up zou op den duur de analytische specificaties van deze test kunnen verbeteren.

Bijna alle mannen met negatieve puncties hadden volgens de histologie chronische ontsteking in hun puncties. Omdat de negatief voorspellende waarde van deze PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse 90% is, kan hiermee worden aangetoond dat deze goedaardige aandoening van de prostaat de PCA3^{DD3}/PSA-ratio's niet beïnvloedt. Dit is in overeenstemming met het feit dat PCA3^{DD3} niet tot expressie komt in leukocyten, die aanwezig zijn bij ontstekingsprocessen.

Nog belangrijker is het feit, dat van de 24 mannen met prostaatkanker er 16 een positieve PCA3^{DD3}/PSA-ratio hadden. Dit impliceert, dat de PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse in urinesedimenten een gevoeligheid heeft van 67%. In de urinesedimenten van 8 mannen met prostaatkanker en een lage PCA3^{DD3}/PSA-ratio werden wel PSA-mRNA-transcripten gevonden. Dit geeft aan, dat in deze urinesedimenten prostaatcellen aanwezig zijn. De lage PCA3^{DD3}-mRNA-expressie in deze urinesedimenten doet vermoeden dat het hier om normale prostaatcellen gaat. Dit wijst erop, dat ook niet-maligne prostaatcellen in de urine komen na rectaal toucher.

Recent hebben twee onderzoeksgroepen het potentieel van de detectie van prostaatcellen in urinesedimenten na uitgebreid rectaal toucher bevestigd. Het gebruik van telomeraseactiviteit voor de detectie van prostaatkankercellen in de urinesedimenten van 36 mannen had een gevoeligheid van 58% en een specificiteit van 100% (18). De negatief-voorspellende waarde van deze test was 55%. Een DNA-gebaseerde detectiemethode die gericht is op de hypermethylering van de promotor van het glutathion-S-transferase-P1-(GSTP1)-gen, de meest voorkomende DNA-verandering die met prostaatkanker geassocieerd wordt, werd getest op 92 mannen (19). Deze test had een gevoeligheid van 73% en een specificiteit van 98% voor de detectie van prostaatkanker. De negatief voorspellende waarde van deze test was 80%.

Vergeleken met deze twee testen, heeft de op PCA3^{DD3}-gebaseerde kwantitatieve RT-PCR-analyse van urinesedimenten de hoogste negatief voorspellende waarde (90%). Vanzelfsprekend is een vergelijkende studie nodig om de relatieve analytische accuraatheid van deze testen ten opzichte van elkaar te kunnen vergelijken. Recent is er een publicatie verschenen over een onafhankelijke validatie studie met PCA3^{DD3}-ge-

baseerde diagnostiek (20). De zogenaamde uPM3-test is een op nucleïnezuur gebaseerde amplificatiemethode die zowel het aantal PSA-mRNA-transcripten als PCA3^{DD3}-mRNA-transcripten in urinesedimenten kan bepalen. De accuraatheid van deze uPM3-test was 78%. De test had een gevoeligheid van 82% en een specificiteit van 76% voor de detectie van prostaatkanker. De negatief-voorspellende waarde was 87%. Het bewijst dat PCA3^{DD3}-gebaseerde diagnostiek de aanwezigheid van prostaatkanker met hoge accuraatheid kan voorspellen werd geleverd in een andere recente publicatie (21). In deze studie was de accuraatheid van de uPM3-test 81% en die van serum-PSA 40%. De gevoeligheid, specificiteit, en negatief voorspellende waarde van deze uPM3-test was respectievelijk 66%, 89% en 87%. Een belangrijke toepassing van deze nieuwe urinetest is dat deze kan bijdragen aan het reduceren van het aantal onnodige puncties (22). Van elke 100 mannen met een serum-PSA-waarde >3 ng/ml, wordt er slechts bij 20 d.m.v. sextant-biopsie en histopatologisch onderzoek prostaatkanker aangetoond en bij maar liefst 80 niet. Dat houdt in, dat 80 mannen alleen maar puncties zullen ondergaan om vast te stellen dat het loos alarm is geweest. Indien dezelfde 100 mannen met een serum-PSA-waarde >3 ng/ml een PCA3^{DD3}-test krijgen, zullen er uiteindelijk nog maar 17 mannen een negatief sextant-biopsie hebben. Zoals eerder beschreven, zullen kleine en goed gedifferentieerde prostaattumoren niet zo gemakkelijk cellen loslaten waardoor ze moeilijk te detecteren zijn (18). Het zou dan ook zo kunnen zijn, dat de kankercellen die vanuit de prostaat in de urine terechtkomen, deel uitmaken van de meer agressieve tumoren. Het is dus mogelijk, dat de tumoren die de test mist, de minder agressieve tumoren zijn. Als dit zou kloppen, dan vermindert deze test het verschijnsel van overdiagnose. De klinische implementatie, het bepalen van het precieze toepassingsbereik van de test, vereist nog verder klinisch onderzoek.

Slotopmerkingen

De hier beschreven urinetest is de eerste test voor het opsporen én uitsluiten van prostaatkanker die uitgaat van moleculaire DNA/RNA-technologie. Hoewel de test iets complexer is dan een PSA-bepaling, kan de test bij een patiënt goed worden afgenomen. Wel is het van belang het rectaal toucher goed uit te voeren om ervoor te zorgen dat de tumorcellen vanuit de prostaat in de urine terechtkomen. Daarom wordt de techniek van rectaal toucher gestandaardiseerd om de mobilisatie van maligne prostaatcellen in de urine te bevorderen.

Het UMCN is eigenaar van het patent op de nieuwe urinetest. Hoofdlicentiehouders zijn het Canadese bedrijf Diagnostics en de Amerikaanse firma Gen-Probe werkt momenteel aan de vertaling van deze analyse naar een urinetest, die in de toekomst in principe in elk gespecialiseerd laboratorium kan worden uitgevoerd. Momenteel lopen er op internationaal niveau studies om de nieuwe urinetest te valideren als marker voor screening op prostaatkanker.

Literatuur

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8-29.
2. Jensen OM, Esteve J, Møller H, et al. Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer* 1990; 26: 1167-1256.
3. Schröder FH, Maas P van der, Beemsterboer P, et al. Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1817-1823.
4. Schröder FH. Diagnosis, characterization and potential clinical relevance of prostate cancer detected at low PSA ranges. *Eur Urol* 2001; 39 Suppl 4: 49-53.
5. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994; 151: 1283-1290.
6. Djavan B, Zlotta A, Remzi M, et al.: Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: a prospective study of 1,051 men. *J Urol* 2000; 163: 1144-1148.
7. Murphy GP, Barren RJ, Erickson SJ, et al. Evaluation and comparison of two new prostate carcinoma markers. Free-prostate specific antigen and prostate specific membrane antigen. *Cancer* 1996; 78: 809-818.
8. Xu LL, Srikantan V, Sesterhenn IA, et al. Expression profile of an androgen regulated prostate specific homeobox gene NKX3.1 in primary prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 972-979.
9. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene* 2000; 19: 1288-1296.
10. Sun Y, Lin J, Katz AE, et al. Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. *Cancer Res* 1997; 57: 18-23.
11. Srikantan V, Zou Z, Petrovics G, et al. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12216-12221.
12. Oettgen P, Finger E, Sun Z, et al. PDEF, a novel prostate epithelium-specific Ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275: 1216-1225.
13. Lin B, Ferguson C, White JT, et al. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res* 1999; 59: 4180-4184.
14. Nelson PS, Gan L, Ferguson C, et al. Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3114-3119.
15. Bussemakers MJ, Bokhoven A van, Verhaegh GW, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 5975-5979.
16. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, Oort I van, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003; 44: 8-15.
17. Meng FJ, Shan A, Jin L, Young CY. The expression of a variant prostate-specific antigen in human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 305-309.
18. Meid FH, Gygi CM, Leisinger HJ, et al. The use of telomerase activity for the detection of prostatic cancer cells after prostatic massage. *J Urol* 2001; 165: 1802-1805.
19. Goessl C, Muller M, Heicappell R, et al. DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage. *Urology* 2001; 58: 335-338.
20. Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3^{PCA3} RNA analysis in urine - A new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol* 2004; 46: 182-187.
21. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, et al. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* 2004; 64: 311-316.
22. Hessels D, Verhaegh GW, Schalken JA, Witjes JA. Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 513-526.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 37-41

Meten tussen de regels door: kwaliteitsbewaking bij tumormarkerbepalingen

P.P.C.A. MENHEERE

Kwaliteitsbewaking van klinisch-chemische bepalingen moet aansluiten bij de dagelijkse praktijk. Dit betekent dat alle stappen binnen het totale proces moeten worden onderworpen aan kwaliteitsbewaking. Gerapporteerde resultaten moeten vergelijkbaar zijn met eerdere resultaten bij dezelfde patiënt, met resultaten in andere laboratoria en met beschrijvingen in de literatuur van groepen van patiënten met een-

zelfde aandoening. Pas dan kunnen patiënten veilig overeenkomstig (inter)nationaal aanvaarde protocollen behandeld worden.

Aspecten van de kwaliteitsbewaking van de preanalytische fase, de analytische fase en de postanalytische fase worden besproken.

De preanalytische fase

Variaties in het preanalysetraject worden veelal voorkomen door het werken volgens vaste protocollen, waarin gedefinieerd wordt op welk tijdstip geprikt moet worden (nuchter, niet-nuchter, dag-nachtritme, enz.), waar het bloed moet worden afgenomen (veneus, arterieel, capillair, enz.), wat voor soort bloed-

Correspondentie: Dr.ir. P.P.C.A. Menheere, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Afdeling Klinische Chemie/Endocrinologie, Postbus 5800, 6202 AZ Maastricht
E-mail: menheere@klinchem.azm.nl