

De functie van prostaat-specifiek membraan antigeen (PSMA) in de prostaat en de rol van PSMA in de oncogenese en progressie van prostaatkanker

M.S. Roos, BSc¹; H. Veerman, MD^{1,2,3}; W. Vogel, MD, PhD^{4,5}; M. Donswijk, MD⁴; A.N. Vis, MD, PhD^{2,3}; D.E. Oprea-Lager, MD, PhD⁶; P.J. van Leeuwen, MD, PhD^{1,3}; E. Bekers, MD⁷; prof. H.G. van der Poel, MD, PhD^{1,2,3}

¹Afdeling Urologie, ²Afdeling Urologie, Amsterdam Universitaire Medische Centra, locatie VUmc, ³Prostaatkankernetwerk Nederland, ⁴Afdeling Nucleaire geneeskunde, ⁵Afdeling Radiotherapie, ⁶Afdeling Radiologie en Nucleaire geneeskunde, Amsterdam Universitaire Medische Centra, locatie VUmc, ⁷Afdeling Pathologie, ^{1,4,5,7}Nederlands Kanker Instituut; Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis

Abstract

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is a glutamate carboxypeptidase II, with two enzymatic activities, folate hydrolase and NAALADase. It is expressed in benign prostate tissue and highly overexpressed in prostate adenocarcinomas. Therefore, PSMA-based imaging techniques, such as PSMA-targeted PET/CT, are important for the diagnosis of prostate cancer. However, the function of the PSMA expression and enzymatic activities in the prostate and oncogenesis are not well known. Understanding of the biological role of PSMA may help improve the diagnosis of prostate cancer. The aim of this literature review is to discover the potential role of PSMA in benign and malignant prostate tissue. This review describes the expression pattern and regulation, including the cytosolic splice variant PSM'. The enzymatic activities are also examined. This has led to our conclusion that the expression ratio between PSMA/PSM' is involved in the oncogenesis and progression of prostate cancer. Furthermore, the products of the enzymatic activities, folate and glutamate, seem to be important

components of the prostatic fluid. Additionally, these molecules are involved in the progression of prostate cancer and the activation of the PI3K/AKT and cAMP/PKA oncogenic pathways. Taken together, this research increases the understanding of the PSMA expression in benign prostate tissue and the function of PSMA in oncogenesis and progression of prostate cancer.

Introductie

Prostaatkanker is de op een na meest voorkomende maligniteit bij mannen (1). Er zijn verschillende diagnostische technieken beschikbaar om patiënten te stadiëren om vervolgens de meest geschikte behandeling te kiezen. De prostaat-specifiek membraan antigeen (PSMA) positron emissie tomografie/computer tomografie (PET/CT) wordt steeds meer toegepast in de diagnostiek van prostaatkanker. De PSMA PET/CT wordt in de primaire setting voornamelijk gebruikt om (afstands-) metastases uit te sluiten en in de gerediveerde setting om de locatie van het recidief of de uitgebreidheid van (gemetastaseerde) ziekte aan te tonen (2). PSMA is een transmembraan glutamaat carboxypeptidase II (GCP II) dat tot expressie komt in prostaatweefsel en tot overexpressie

komt in primaire prostaat adenocarcinomen en metastasen (3). Naast PSMA-gebaseerde beeldvormingstechnologieën, wordt er veel onderzoek en klinische trials uitgevoerd naar nieuwe PSMA-gerichte therapieën, zoals radioligand therapie en immunotherapie (2). Hoewel PSMA reeds gebruikt wordt voor beeldvorming en onderzoek, is er nog relatief weinig bekend over de functie van PSMA in de prostaat en in de oncogenese en progressie van prostaatkanker.

Het doel van deze review is om te begrijpen waarom PSMA tot expressie komt in benigne prostaatweefsel en wat de functie van PSMA is in de oncogenese en progressie van prostaatkanker vanuit een biochemisch perspectief. Onze hypothese is dat de enzymatische activiteiten van PSMA essentiële functies hebben in zowel benigne als maligne prostaatweefsel. In dit artikel zullen de volgende onderwerpen aan bod komen: de structuur van PSMA, het expressie patroon, de regulatie, enzymatische activiteit en toepassing van PSMA in de diagnostiek naar prostaatkanker.

Structuur van PSMA

PSMA wordt gecodeerd door het gen FOLH1 dat gelokaliseerd is op chromosoom 11p11-12, en 19 exonen

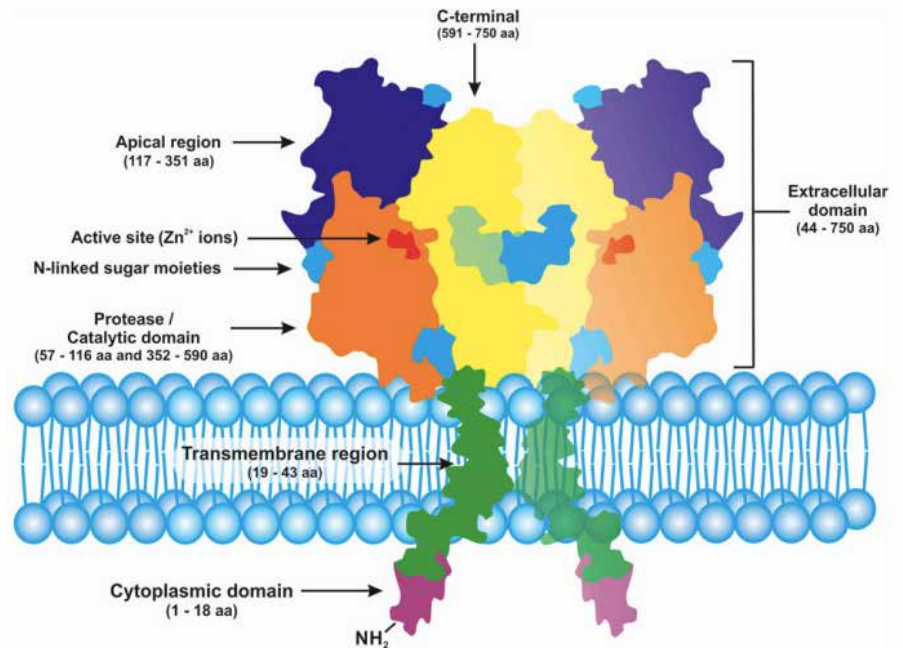
bevat (4,5). Het is een glutamaat carboxypeptidase II met folaat hydrolase en N-acetyl-L-aspartyl-Lglutamaat peptidase (NAALDase) enzymatische activiteiten. Het bestaat uit ongeveer 750 aminozuren en heeft drie hoofddomeinen; een groot extracellulair domein, een hydrofoob transmembraan domein, en een kort cytoplasmatisch N-terminaal (figuur 1) (6,7).

Extracellulaire domein

Het extracellulaire C-terminaal kan liganden die in de extracellulaire vloeistof aanwezig zijn binden, waarna het PSMA zijn functie kan uitvoeren. Dit extracellulaire deel bevat een dimerisatie domein om PSMA-homodimeren non-covalent te binden, wat noodzakelijk is voor de enzymatische activiteit. Daarnaast bevat het extracellulair domein tien potentiële N-glycosyleringsplaatsen. De glycosylering voorkomt afbraak door proteolytische enzymen en zorgt ervoor dat het na synthese met de juiste oriëntatie in het apicale membraan terecht komt. Daarnaast is de glycosylering ook betrokken bij de vouwing en enzymatische activiteiten (8). Verder bevat het extracellulaire domein de actieve centra voor de enzymatische activiteiten folaathydrolase en NAALADase. Deze actieve zijde bestaat uit twee pockets, de S1 en S1' pocket (9,10). De S1' pocket is amfipatisch, zowel hydrofoob als hydrofiel, wat resulteert in zeer specifieke polaire en apolaire interacties met het substraat. De S1 pocket is minder specifiek door een argininepatch wat zorgt voor een hoge affiniteit voor negatief geladen residuen. Daarnaast is de S1 pocket groter dan de S1' pocket waardoor er ook meer variatie mogelijk is.

Cytosolische domein

Het cytosolische N-terminaal van PSMA bevat een internaliseringsmotief dat betrokken is bij endocytose, het volledig binnen de cel opnemen van



Figuur 1. Schematisch overzicht van de structuur van PSMA. PSMA bestaat uit ongeveer 750 aminozuren (aa), een cytosolisch N-terminaal, een enkele membraan overspannende hydrofobe transmembraanhelix en een groot extracellulair domein. Het extracellulaire domein bevat het enzymatische domein, de actieve site en het C-terminaal. (6)

PSMA (11). Er zijn twee categorieën van internalisatie signalen, tyrosine-gebaseerde en di-leucine-gebaseerde motieven. PSMA heeft een uniek internalisatiesignaal "MXXXL", waarbij het eerste aminozuur methionine en het vijfde aminozuur leucine essentieel zijn voor de internalisatie. Wanneer één van deze twee aminozuren gemuteerd is, vindt er geen internalisatie plaats. De enzymatische activiteiten van PSMA hebben geen effect op de internalisatie snelheid.

Daarnaast associeert het cytosolische N-terminaal met filamine A (FLNa), een dimeer eiwit dat zich in het corticale cytoplasma bevindt (12). FLNa zorgt voor crosslinking van F-actine en dient als docking site voor receptoren en signaalmoleculen. De associatie van PSMA met FLNa vermindert de internalisatie snelheid met 50% (12). Dit zou verklaard kunnen worden door de stabilisatie van PSMA op het membraan door de interactie

met het actieve cytoskelet, of de interactie met FLNa zou de binding kunnen verhinderen van eiwitten die nodig zijn voor clathrin-afhankelijke endocytose.

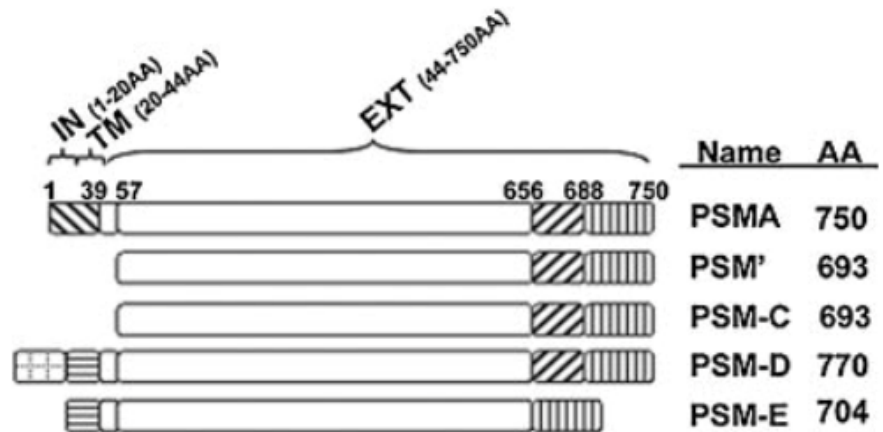
FLNa is betrokken bij de recycling van PSMA terug naar het celmembraan. In cellen zonder FLNa bleef geïnternaliseerd PSMA in vesicles (12). Of PSMA specifiek gerecycled wordt door FLNa of dat FLNa een centrale rol speelt in de organisatie en het onderhoud van endosomen en recycling is niet bekend. Verder vermindert de interactie met FLNa de NAALADase activiteit met 64%. Dit kan mogelijk verklaard worden door een conformatie verandering van het extracellulair domein wat resulteert in een lagere affiniteit voor het substraat. De functie van PSMA internalisatie is nog onbekend, wat erop zou kunnen wijzen dat PSMA zorgt voor het transport van een ongeïdentificeerd ligand (12,13).

Expressie patroon en regulatie

PSMA-expressie in verschillende weefsels

PSMA komt tot expressie in het prostaat epitheel en de expressie is verhoogd in prostaat adenocarcinomen en metastases (7,14). De hoogste PSMA-expressie is aangetoond in androgeen resistente prostaat kanker (9). In paragraaf 3.3 zal de relatie tussen PSMA-expressie en androgeen resistentie uitgebreider beschreven worden. De PSMA-expressie heeft een sterke correlatie met de graad van de tumor, wat erop kan wijzen dat PSMA een functie heeft in de oncogenese en progressie van prostaat kanker (9,10,14). Mogelijke cellulaire mechanismen van de rol van PSMA in prostaat kanker zullen later worden beschreven.

PSMA-expressie is ook aangetoond in de neovasculatuur van de meeste solide tumoren maar is afwezig in normale vasculatuur (9). Dit suggereert dat PSMA betrokken is bij vasculogene *pathways*. PSMA-expressie is ook aangetoond in andere weefsels, zoals de dunne darm, proximale tubuli van de nieren, speekselklieren en het centrale en perifere zenuwstelsel (9). In deze verschillende weefsels heeft PSMA verschillende functies, en dus verschillende namen (10,13). De functie van PSMA in de dunne darm, waar het folaathydrolase wordt genoemd, is het verwijderen van glutamaten uit folaat uit de voeding, om gemonoglutameerd folaat te verkrijgen dat door de cellen van de dunne darm kan worden geabsorbeerd. In het zenuwstelsel wordt het N-acetyl- α -linked acidic dipeptidase (NAALADase) genoemd en heeft het de functie om N-acetylaspartylglutamaat (NAAG) te hydrolyseren tot de neurotransmitter glutamaat. De functie van PSMA in de nieren en in de speekselklieren is nog onbekend.



Figuur 2. Schematisch overzicht van de eiwitsequenties van de PSMA splice varianten. De patronen geven overeenkomende aminozuur sequenties weer. AA = aminozuren; IN = intracellulaire domein; TM = transmembraan domein; EXT = extracellulair domein. (15)

PSMA-splice varianten

Er zijn vier splice varianten van PSMA bekend: PSM', PSM-C, PSM-D en PSM-E (figuur 2)(15,16). De PSM' variant gebruikt een andere donor site in het eerste exon, waardoor het intracellulaire en transmembraan domein niet aanwezig zijn, wat resulteert in een cytosolisch eiwit. PSM-C en PSM-D gebruiken dezelfde donor site als PSM' maar gebruiken allebei ook een andere acceptor site in het eerste exon. De PSM-E variant is meer afwijkend vergeleken de andere varianten, en bevat een nieuw uniek exon en een grote deletie. (17). PSM' komt voornamelijk tot expressie in gezond prostaatweefsel en de mRNA ratio van PSMA/PSM' neemt toe met het tumor stadium (15). Daarnaast is het aangetoond dat PSM' enzymatisch activiteit heeft. PSM' is geglycosyleerd, dit is essentieel voor enzymatische activiteit. De glycosylering suggereert dat PSM' gemodificeerd wordt in het Golgiapparaat. Daarom zou naast alternatieve splicing, PSM' ook gegenereerd kunnen worden door posttranslationele klieving van PSMA (15). De expressie van PSM-C vertoont geen expliciete veranderingen tussen goedaardig en kwaadaardig prostaatweefsel en de expressie van PSM-D wordt vooral gevonden

in metastasen (16). De expressie van PSM-E is gecorreleerd met de progressie van de tumor en er is zelfs aangetoond dat deze expressie weefsel- en pathologie specifiek is dan de expressie van PSMA (17).

Tijdens de PSMA PET/CT worden er tracers gebruikt die specifiek binden aan PSMA. Afhankelijk van de bindingsplaats van de tracer is het mogelijk dat ook de splice varianten gedetecteerd worden. Verder kunnen deze varianten mogelijke effecten hebben op de ontwikkeling en progressie van prostaat kanker, maar er is weinig bekend over hun eiwitfunctie.

Expressie regulatie

De expressie van PSMA wordt door verschillende mechanismen gereguleerd. Aan het 5' einde van de genomische sequentie van PSMA is een CpG eiland aanwezig. Dit strekt zich uit van het eerste exon tot het eerste intron (3). De cytosines van CpG eilanden kunnen gemethyleerd worden door DNA-methyltransferases, wat kan leiden tot silencing van het gen. De aanwezigheid van het CpG eiland in het PSMA gen geeft dus aan dat de expressie van PSMA gereguleerd kan worden door DNA methylering.

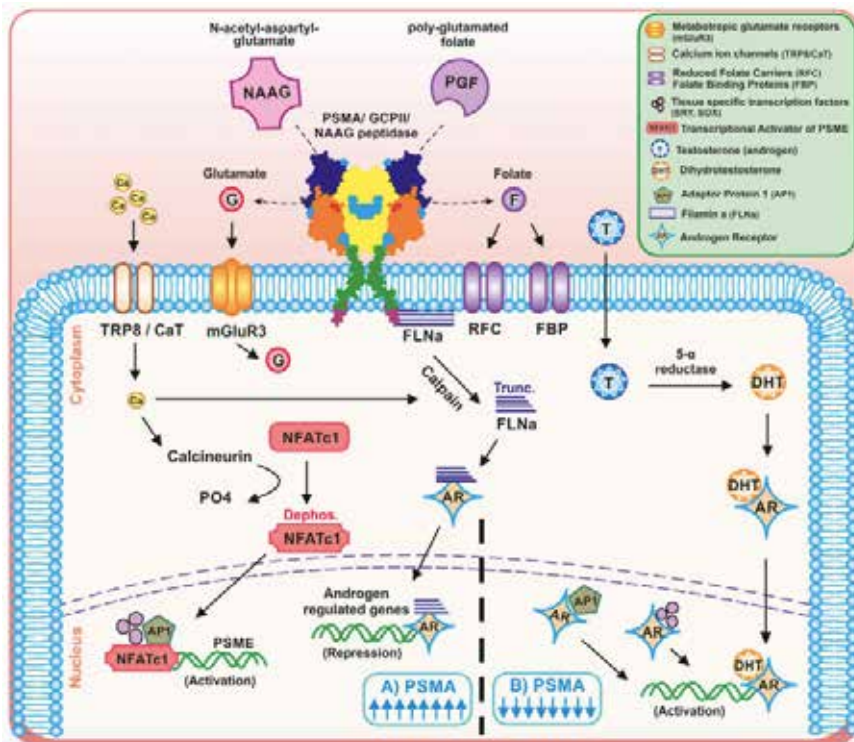
Daarnaast zijn er meerdere mechanismen die de PSMA-expressie in de prostaat beïnvloeden door regulatie van de PSMA enhancer (figuur 3) (6,13). De NAALADase activiteit van PSMA hydrolyseert NAAG tot glutamaat, dat metabotrope glutamaat receptoren (mGluRs) activeert. De activatie van mGluRs kan leiden tot de modulatie van ionenkanalen, resulterend in een Ca^{2+} influx. Er zijn twee manieren waarop Ca^{2+} de PSMA-expressie kan doen toenemen. Ca^{2+} defosforyleert en activeert de transcriptiefactor nucleaire factor van geactiveerde T-cellen (NFATc1). De defosforylering van NFATc1 veroorzaakt translocatie naar de kern, waar het bindt aan PSMA enhancer en andere transcriptiefactoren en de transcriptie van PSMA activeert (figuur 3A).

Een andere Ca^{2+} -afhankelijke *pathway* voor de upregulatie van PSMA betreft de androgeenreceptor (AR). AR is een hormonale transcriptiefactor die andere AR-gereguleerde genen kan activeren, wat leidt tot een downregulatie van PSMA (6). Ca^{2+} zorgt voor activatie van de protease calpain, wat FLNa knipt (18). Het overgebleven C-terminale fragment van FLNa bindt aan AR en verhindert interacties en onderdrukt daarmee de AR-activiteit wat leidt tot een verhoogde PSMA-expressie (figuur 3A).

AR is ook betrokken bij de downregulatie van PSMA (6). Testosteron wordt omgezet in dihydrotestosteron (DHT), dat aan AR bindt en een conformatieverandering veroorzaakt wat AR activeert. DHT

en AR lokaliseren zich samen in de kern, waar AR-gereguleerde genen tot expressie komen, en PSMA wordt gedownreguleerd. Bovendien kan AR zich binden aan transcriptiefactoren die PSMA-transcriptie activeren, waardoor deze transcriptiefactoren niet kunnen binden aan het PSMA gen, wat resulteert in de onderdrukking van PSMA-expressie (figuur 3B).

Het AR-afhankelijke PSMA-expressie regulatiemechanisme kan veranderen tijdens androgeen deprivatie therapie (ADT) (19). AR is niet alleen betrokken bij de regulatie van de PSMA-expressie maar is ook essentieel voor de groei en overleving van prostaatkankercellen. Daarom is AR een geschikt doelwit voor prostaatkankertherapieën. Verminderde aanwezigheid of werking van DHT kan bewerkstelligd worden door een orchidectomie, AR-remmers of het meest gebruikelijke, Luteïniserend Hormoon Releasing Hormoon (LHRH) antagonisten of agonisten (20). Kortdurende ADT verhoogt de expressie van PSMA als gevolg van de onderdrukte AR activiteit, wat resulteert in overexpressie van PSMA. Langdurige ADT vermindert de expressie van PSMA. Omdat AR van cruciaal belang is voor de overleving van de cellen, kunnen er verschillende veranderingen in de AR-signaleringsroute ontstaan (21,22). Deze veranderingen kunnen de gevoeligheid voor androgenen verhogen. Daarnaast kunnen de veranderingen ook leiden tot androgeen-onafhankelijke activatie van AR. Dit kan ontstaan door *missense* mutaties in het ligand bindingsdomein of splice-varianten die het ligand-bindingsdomein overslaan, wat resulteert in de activatie door andere eiwitten, groeifactoren of tyrosine kinases. Bovendien kunnen er ook *pathways* ontstaan die leiden tot cel overleving in de afwezigheid



Figuur 3. Schematisch overzicht van de PSMA-expressie regulatie. (A) Upregulatie van PSMA door Ca^{2+} afhankelijke activatie van transcriptiefactor NFATc1 en protease calpain. Calpain knipt FLNa dat de AR activiteit negatief reguleert. (B) Downregulatie van PSMA door AR activatie door DHT en wegvangen van transcriptiefactoren nodig voor PSMA-expressie. (6)

van AR door de apoptose te remmen of de proliferatie te vergemakkelijken. Deze veranderingen komen vaker voor bij androgeenresistente prostaatkanker en metastasen.

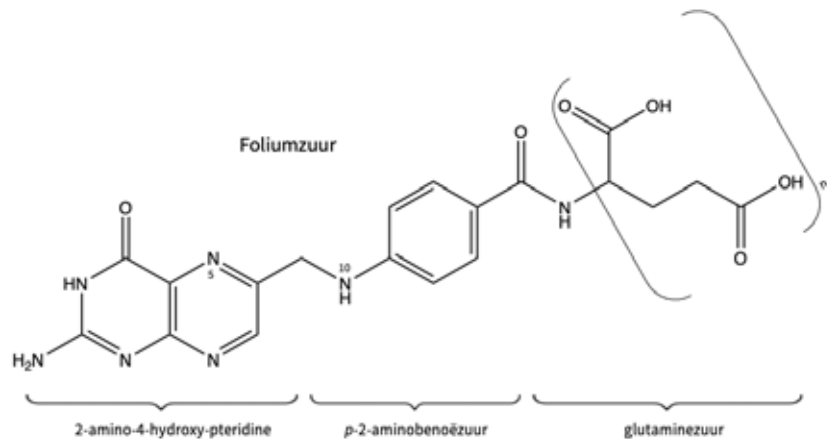
Enzymatische activiteiten

Folaat hydrolase

Folaat, of tetrahydrofolaat (THF), is een essentiële voedingsstof die ook wel bekend staat als vitamine B9 (23). Folaat kan chemisch gemodificeerd worden door de lengte van de glutamaat zijketen, de oxidatietoestand, en de toevoeging van koolstof eenheden (24). De volledig geoxideerde vorm van folaat, foliumzuur, wordt gebruikt in verrijkte voedingsmiddelen en supplementen (figuur 4). Foliumzuur is meestal gepolyglutameerd en PSMA kan de glutamaten verwijderen om gemonoglutameerd folaat te krijgen. De cellulaire opname van folaat wordt gefaciliteerd door folaatreceptoren (FOLHR). Intracellulair folaat wordt gepolyglutameerd om te voorkomen dat het weer uit de cel wordt getransporteerd.

Folaat is essentieel voor het koolstofmetabolisme, dat de foliumzuur- en methioninecyclus omvat. Deze cycli zijn nodig voor de synthese van thymidine, purines, aminozuren en methyleringsreacties (25). Deze methyleringsreacties zijn betrokken bij onder andere het epigenetisch onderhoud en de regulatie van genexpressie door de methylering van DNA en histonen.

De functie van de folaat hydrolase activiteit van PSMA in prostaatkanker kan mogelijk verklaard worden door de behoefte van folaat voor spermatozoa. Folaat is nodig voor de synthese van nucleotiden die nodig zijn voor de DNA-replicatie tijdens de celdelingen na de bevruchting. De spermatozoa in de testikels zijn niet voorzien van een folaatreceptor (FOLR) (26). Een oplosbare vorm



Figuur 4. Structuur van foliumzuur, de volledig geoxideerde vorm van folaat. Koolstofeenheden kunnen worden toegevoegd op de N-5 en/of N-10 posities. Glutamaat residuen kunnen worden toegevoegd door middel van een glutamaat-peptide binding.

van FOLR, FOLR1, wordt door de zaadleiters afgescheiden, waar FOLR1 zich aan de spermatozoa in het sperma hecht en folaat kan worden opgenomen. Foliumzuur is essentieel voor spermatozoa, waardoor het een belangrijk bestanddeel van de prostaatvloeistof is.

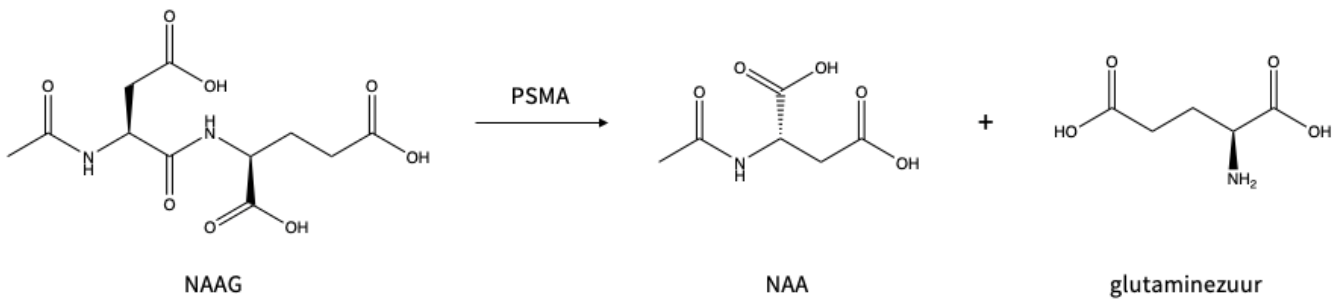
Een tekort aan foliumzuur kan leiden tot een misincorporatie van uracil in het DNA, wat leidt tot enkel- en dubbelstrengs DNA-breuken en afwijkingen in de DNA methylering (24). Dit kan resulteren in de ontwikkeling van kanker. De PSMA/PSM' ratio neemt toe met het tumorstadium, wat betekent dat goedaardige prostaatkanker relatief meer PSM' bevat dan kwaadaardig prostaatkanker. De folaathydrolase enzymatische activiteit van PSM' in het cytosol kan de aan foliumzuur toegevoegde polyglutamaatketens verwijderen, waardoor foliumzuur de cel kan verlaten. Dit kan leiden tot foliumzuurtekort en dus tot de oncogenese van prostaatkanker.

Yao et al. hebben aangetoond dat PSMA-expressie de cellulaire folaatopname en proliferatie verhoogt

(27). Dit onderzoek maakte gebruik van de PC-3 cellijn, die afkomstig is van botmetastasen van prostaatkanker. PC-3 cellen met PSMA-expressie vertoonden een significant hogere proliferatie vergeleken met PC-3 cellen zonder PSMA-expressie, wanneer gepolyglutameerd folaat werd toegevoegd. Om te bevestigen dat de folaathydrolase activiteit van PSMA zorgde voor de folaatopname, werd de PSMA-remmer 2-PMPA (2-fosfonomethyl pentaandizuur) gebruikt. De cellen met PSMA-expressie en activiteit waren in staat om twee keer zoveel foliumzuur op te nemen. Deze resultaten suggereren dat PSMA-expressie cellen een proliferatievoordeel geeft, wat een belangrijke rol speelt bij de ontwikkeling van kanker.

NAALADase

De NAALADase enzymatische activiteit van PSMA hydrolyseert N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamaat (NAAG) tot N-acetyl-aspartaat (NAA) en glutamaat (figuur 5) (28). Glutamaat is een neurotransmitter en is betrokken bij verschillende metabolische *pathways*, waaronder de synthese van verschillende



Figuur 5. NAALADase activiteit. De NAALADase enzymatische activiteit van PSMA om NAAG om te zetten in NAA en glutaminezuur.

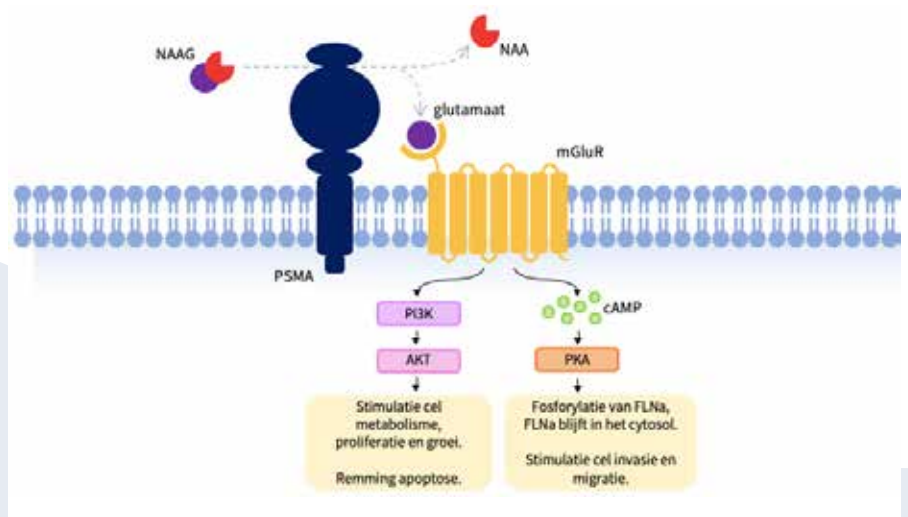
metabolieten, aminozuren, nucleotiden, en neurotransmitters (29). Glutamaat heeft verschillende receptoren (30). Er is aangetoond dat de G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCR), de mGluRs, tot expressie komen op spermatozoa (31,32). De functie van NAALADase van PSMA zou kunnen zijn om de prostaatvloeistof van glutamaat te voorzien. Glutamaat kan belangrijk zijn voor celdeling na bevruchting van de eicel door spermacellen door het stimuleren van celproliferatie en de synthese van metabolieten, aminozuren en nucleotiden. Als glutamaat de cel proliferatie stimuleert, suggereert dat ook dat PSMA betrokken is bij de ontwikkeling en/of progressie van prostaatkanker. Het is aangetoond dat mGluRs interageren met oncogene signaal *pathways*, en dat zij in prostaatumoren geüpereguleerd zijn (33).

Een van deze oncogene signaal *pathways* is de PI3K/AKT-*pathway*, die cruciaal is voor celgroei en overleving (figuur 6) (33,34). Na de hydrolyse van NAAG door PSMA, kan het vrije extracellulaire glutamaat binden aan de mGluR. Dit activeert de mGluR wat resulteert in de activering van fosfoinositide 3-kinase (PI3K), een lipide kinase. Via de fosfo-activatie van andere kinase leidt de activatie van PI3K indirect tot de fosfo-activatie van serine-threonine kinase (AKT). AKT fosforyleert eiwitten die betrokken zijn bij celmetabolisme, proliferatie

en groei. De glucose-opname wordt gestimuleerd en apoptose wordt geremd (35). Tumorprogressie is vaak gecorreleerd met mutaties die leiden tot over activatie van deze PI3K/AKT *pathway*. Hoge glutamaat spiegels kunnen ook leiden tot over activatie, en dus tot de ontwikkeling van kanker.

Een andere oncogene signaal *pathway* die geactiveerd kan worden door mGluRs is de cyclische adenosine monofosfaat (cAMP) *pathway* (figuur 6). De activatie van cAMP resulteert in de activatie van de eiwit kinase A (PKA) (36). PKA kan FLNa fosforyleren,

wat de splitsing van FLNa door calpain en daarmee de nucleaire lokalisatie verhindert (37). Eerder onderzoek toonde aan dat in goedaardig prostaatweefsel FLNa voornamelijk gelokaliseerd is in de kern, en in metastaserende prostaatkanker voornamelijk in het cytoplasma (36). Bovendien is aangetoond dat de remming van PKA de invasieve kenmerken van de cel vermindert. Dit suggereert dat cytosolisch FLNa cel invasie en migratie stimuleert. Deze cAMP/PKA-route is een andere manier waarop PSMA bijdraagt aan de progressie van prostaatkanker.



Figuur 6. Schematisch overzicht oncogene signaal *pathways* geactiveerd door mGluR. NAAG wordt door PSMA omgezet in NAA en glutamaat. Glutamaat activeert de mGluR waardoor oncogene signaal *pathways* geactiveerd worden. (1) PI3K wordt geactiveerd en fosforyleert AKT. (2) cAMP wordt geactiveerd wat resulteert in de activatie van PKA.

PSMA-toepassingen PSMA-immunohistochemie

Immunohistochemie (IHC) is een techniek op basis van microscopie om specifieke cellulaire componenten in cellen en weefsels zichtbaar te maken (38). Het wordt gebruikt voor diagnostische en onderzoeksdoeleinden. De toegenomen identificatie van pathologische moleculen heeft de toepassingsmogelijkheden van IHC uitgebreid.

Er zijn verschillende manieren waarop IHC-kleuring kan worden uitgevoerd. De optimale procedure hangt af van het type weefsel, het antigeen en het doel van het onderzoek. De eerste stap is het verkregen weefsel in kleinere blokken te snijden die vervolgens worden gefixeerd, om cellulaire processen te beëindigen en degradatie te voorkomen (38-40). Dit wordt gewoonlijk gedaan door formalinefixatie en paraffine-embedding. Na de fixatie worden de blokken in dunne plakjes van 3-5 µm gesneden. Soms is antigeen retrieval nodig om de antigeendetectie te optimaliseren, hetgeen kan gebeuren door verhitting of door proteasen. Vervolgens kan een directe of indirecte detectiemethode worden gebruikt om het specifieke antigeen te visualiseren. De coupes kunnen worden geanalyseerd onder een microscoop of gescand en geüpload worden naar een database zoals Slide Score.

Er zijn verschillende antilichamen beschikbaar voor PSMA IHC kleuring. Het monoklonale muis anti-PSMA antilichaam (Kloon 3E6; DAKO, North America Inc., Carpinteria, CA, USA) wordt vaak gebruikt. Het op polymeer gebaseerde detectiesysteem EnVision FLEX, High pH wordt aanbevolen bij gebruik van dit antilichaam. Het monoklonale muis anti-PSMA-antilichaam dient als primair antilichaam en bindt aan PSMA in de met formaline

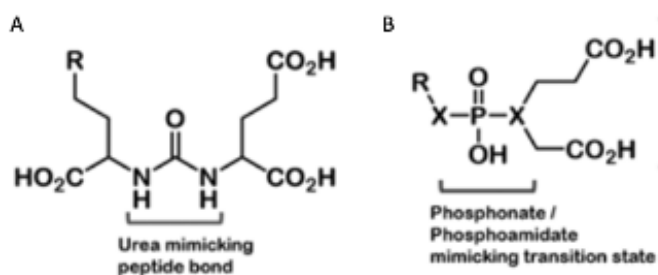
gefixeerde paraffine-ingebedde sectie (38,39). Het secundaire antilichaam, dat aan het primaire antilichaam bindt, is gekoppeld aan het enzym mierikswortelperoxidase (HRP). Wanneer het substraat diaminobenzidine (DAB) wordt toegevoegd, wordt dit door HRP omgezet in een bruin neerslag. Deze bruine kleur vertegenwoordigt de plaats van PSMA-expressie.

PSMA PET/CT

Het eerste PSMA-specifieke beeldvormingsmiddel was het Indium-111 gelabelde PSMA-specifieke antilichaam 7E11-C5.3, ook bekend als [¹¹¹In]In-capromab (41). [¹¹¹In]In-capromab werd door de Food and Drug Agency (FDA) goedgekeurd als diagnostisch middel om prostaatkanker te stadiëren en te lokaliseren. Het werd ook gebruikt om lymfekliermetastasen in beeld te brengen, terwijl het er niet in slaagde botmetastasen op te sporen. Daarnaast heeft [¹¹¹In]In-capromab nog verscheidene andere nadelen. Door de lange halfwaardetijd van 67 uur wordt de patiënt blootgesteld aan een hoge stralingsdosis, en moet [¹¹¹In]In-capromab enkele dagen voor de beeldvorming worden geïnjecteerd (9). Bovendien bindt [¹¹¹In]In-capromab aan het intracellulaire domein van PSMA, waardoor de gevoeligheid en specificiteit van de scans beperkt zijn (41,42). Het gehumaniseerde

monoklonale antilichaam J591 heeft een aantal van deze beperkingen overwonnen. J591 kan gelabeld worden met verschillende radionucliden, zoals Indium-131, Lutetium-177, Zirkonium-89, en Yttrium-90 en kan botmetastasen detecteren. Daarnaast heeft J591 affiniteit voor het extracellulaire domein van PSMA en dus een hogere gevoeligheid. Hoewel de antilichamen veelbelovende resultaten hebben opgeleverd, zijn er nog enkele beperkingen. Antilichamen hebben een trage doelherkenning en klaring (41). Bovendien kunnen hoge concentraties van de antilichamen optreden in neovasculatuur en in de darm, waardoor de interpretatie van de scans een uitdaging is (42).

Om de detectie van kanker te verbeteren, werden meer tracers ontwikkeld. De meest gebruikte tracer voor de beeldvorming van tumoren, 2-[¹⁸F]fluorodeoxyglucose (2-[¹⁸F]FDG), is niet optimaal voor de beeldvorming van prostaatkanker. Dit komt omdat prostaat adenocarcinomen een relatief lage glycolytische snelheid hebben en er een verschil is tussen de glycolytische activiteit van de primaire tumor en de lymfekliermetastasen (43,44). Daarom zijn er nieuwe kleine inhibitor moleculen ontwikkeld op basis van de eigenschappen van de actieve site van PSMA. Deze kleine



Figuur 7. PSMA-inhibitors. (A) Motief op basis van ureum. Bootst het natuurlijke ligand na, maar kan niet worden gehydrolyseerd. (B) Op fosfor gebaseerd motief. Bootst de overgangstoestand van de hydrolysatie reactie na. (10)

inhibitor moleculen hebben een verbeterde farmacokinetiek (41). Door hun laag moleculairgewicht kunnen zij snel worden geabsorbeerd en geklaard. Dit vermindert de stralingsdosis en vergemakkelijkt de beeldvormingsprocedure. De twee meest voorkomende bindingsmotieven voor PSMA-inhibitoren zijn op fosfor gebaseerde en op ureum gebaseerde motieven (figuur 7) (10,45).

Momenteel is het meest gebruikte radioligand voor de PSMA PET/CT de op ureum gebaseerde inhibitor [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 (44). [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 heeft een hoge en specifieke detectiegraad voor primaire prostaatumoren, bot- en lymfekliermetastasen (46). Een beperking van de PSMA-11 inhibitor is dat deze niet gelabeld kan worden met radiometalen die geschikt zijn voor radiofarmaceutische therapie (RPT), en dus alleen gebruikt kan worden voor diagnostiek (44). Daarom is de variant PSMA-617 ontwikkeld, die Lutetium-177 en Actinium-225 kan binden voor respectievelijk β - en α -bestraling. Een nadeel van de PSMA-617 inhibitor is de hoge, niet-PSMA-specifieke opname in speekselklieren (46,47). Dit kan verschillende bijwerkingen veroorzaken, zoals een droge mond en slikproblemen, en bovendien is het dosis-limiterend. De structuur van PSMA-617 wordt recent gebruikt om een andere PSMA-inhibitor te ontwikkelen, zoals het ¹⁸F-gelabelde [¹⁸F]PSMA-1007 en [¹⁸F]F-DCFPyL (44). Met het oog op het grote gebruik van de PET/CT is de grootschalige cyclotron-gebaseerde productie van Fluor-18 door radiosynthese een groot voordeel vergeleken met de beperkte generator-gebaseerde productie van Gallium-68 (44,48). Hoewel de PSMA PET/CT al een effectieve en veel gebruikte methode is voor de stadiëring van prostaatkanker en de detectie van (lokaal)recidief en metastasen, kan deze nog worden

verbeterd door de ontwikkeling van nieuwe radio-gelabelde PSMA-inhibitoren.

Toekomstperspectief

Naast diagnostiek is PSMA een geschikt doelwit voor therapieën. Klinische trials voor het gebruik van de PSMA-inhibitoren als radiotherapie laten veelbelovende resultaten zien (47,49). Bovendien kan PSMA een doelwit zijn voor immunotherapie. Nieuwe therapieën zijn vooral nodig voor de momenteel onbehandelbare gemetastaseerde en androgeenresistente prostaatkanker.

Conclusie

In deze literatuurstudie is de functie van PSMA in benigne en maligne prostaatweefsel onderzocht. Hoewel PSMA gebruikt wordt als beeldvormingsdoelwit voor prostaatkanker, is de functie van PSMA in goedaardig weefsel en de reden van overexpressie van PSMA in kwaadaardig prostaatweefsel weinig onderzocht. Dit literatuuronderzoek heeft geleid tot de conclusie dat zowel de folaat hydrolase als de NAALADase activiteit van PSMA een functie hebben in goedaardig en kwaadaardig prostaatweefsel.

Take-home message

De functie van folaathydrolase en NAALADase in goedaardig prostaatweefsel is het voorzien van de prostaatvloeistof van folaat en glutamaat. Folaat en glutamaat worden beschikbaar voor cellulaire opname door het verwijderen van de γ -gekoppelde glutamaten uit gepolyglutameerd folaat en het omzetten van NAAG in NAA en glutamaat. Het is aangetoond dat spermatozoa zowel folaat- als glutamaatreceptoren bevatten. Folaat en glutamaat zijn nodig voor de synthese van nucleotiden,

en stimuleren zo de celproliferatie, die nodig is tijdens de celdeling na de bevruchting. PSMA heeft verschillende functies bij de ontwikkeling en/of progressie van prostaatkanker. De hoge expressie van de splice variant of posttranslationale proteolytische vorm van PSMA, PSM', in goedaardig prostaatweefsel kan leiden tot een tekort aan folaat. Folaat deficiëntie kan leiden tot de ontwikkeling van kanker door de misincorporatie van uracil in het DNA waardoor enkel- en dubbelstrengs DNA-breuken en afwijkingen in de DNA methylering ontstaan. De overexpressie van PSMA in kwaadaardig prostaatweefsel geeft de cellen een hogere proliferatiesnelheid als gevolg van de overmatige beschikbaarheid van foliumzuur en glutamaat. Daarnaast heeft de NAALADase activiteit van PSMA nog een functie in prostaatkanker. De activering van mGluR door glutamaat kan verschillende oncogene *pathways* activeren, zoals de PI3K/AKT en cAMP/PKA *pathways*. De overactivering van de PI3K/AKT-*pathway* leidt tot stimulering van de proliferatie en remming van apoptose, terwijl de overactivering van de cAMP/PKA-route resulteert in stimulering van cel invasie en migratie. Het is aangetoond dat PSMA geïnternaliseerd wordt via clathrin-afhankelijke endocytose. Hoewel de functie voor deze internalisatie onbekend blijft, kan dit suggereren dat er een ongeïdentificeerd ligand is voor PSMA. Dit ligand zou een groeifactor kunnen zijn en zo een rol kunnen spelen in de ontwikkeling en/of progressie van prostaatkanker. Eerst moet dit ligand voor PSMA geïdentificeerd worden om de functie van PSMA

internalisatie te begrijpen. Het belang van dit onderzoek is om de cellulaire en moleculaire betrokkenheid van PSMA bij de ontwikkeling en progressie van prostaatkanker te begrijpen. Dit kan leiden tot de identificatie van nieuwe doelwitten voor nieuwe (combinatie) therapieën. Hoewel dit onderzoek de connectie tussen PSMA en de PI3K/AKT en cAMP/PKA *pathways* weergeeft, wordt verwacht dat er meer interacties betrokken zijn die nog ontdekt moeten worden. Aangezien oncogene *pathways* in het algemeen over geactiveerd zijn in kanker, is het belangrijk om niet alleen de over geactiveerde *pathways* aan te geven, maar ook de specifieke connectie met PSMA.

h.veerman@nki.nl ◆

Referenties

- Rawla P. Epidemiology of prostate cancer. *World J Oncol.* 2019;10:63-89
- Schatten H. Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. In: Schatten H, editor. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer: Updates, Insights and New Frontiers* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2021 May 17]. p. 1-14. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*). Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_1
- Chung LWK, editor. *Prostate Cancer: Biology, Genetics, and the New Therapeutics* [Internet]. Humana Press; 2001 [cited 2021 May 2]. (*Contemporary Cancer Research*). Available from: <https://www.springer.com/gp/book/9781592590094>
- Israeli RS, Powell CT, Fair WR, Heston WD. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* 1993;53:227-30
- O'Keefe DS, Su SL, Bacich DJ, Horiguchi Y, Luo Y, Powell CT, et al. Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 1998;1443:113-27
- Evans JC, Malhotra M, Cryan JF, O'Driscoll CM. The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease. *Br J Pharmacol.* 2016;173:3041-79
- Rajasekaran AK, Anilkumar G, Christiansen JJ. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2005;288:C975-81
- Barinka C, Šácha P, Sklenář J, Man P, Bezouška K, Slusher BS, et al. Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity. *Protein Sci.* 2004;13:1627-35
- Bařinka C, Rojas C, Slusher B, Pomper M. Glutamate Carboxypeptidase II in diagnosis and treatment of neurologic disorders and prostate cancer. *Curr Med Chem.* 2012;19:856-70
- Wüstemann T, Haberkorn U, Babich J, Mier W. Targeting prostate cancer: Prostate-specific membrane antigen based diagnosis and therapy. *Medicinal Research Reviews.* 2019;39:40-69
- Rajasekaran SA, Anilkumar G, Oshima E, Bowie JU, Liu H, Heston W, et al. A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen. *Mol Biol Cell.* 2003;14:4835-45
- Anilkumar G, Rajasekaran SA, Wang S, Hankinson O, Bander NH, Rajasekaran AK. Prostate-specific membrane antigen association with filamin A modulates its internalization and NAALADase activity. *Cancer Res.* 2003;63:2645-8
- Ghosh A, Heston WDW. Understanding Prostate-Specific Membrane Antigen and Its Implication in Prostate Cancer. In: LaRochelle WJ, Shimkets RA, editors. *The Oncogenomics Handbook* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2005 [cited 2021 Apr 26]. p. 597-615. (*Cancer Drug Discovery and Development*). Available from: <https://doi.org/10.1385/1-59259-893-5:597>
- Hupe MC, Philippi C, Roth D, Kümpers C, Ribbat-Idel J, Becker F, et al. Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA) on biopsies is an independent risk stratifier of prostate cancer patients at time of initial diagnosis. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Dec 20 [cited 2021 Apr 28];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6307416/>
- Mlcochová P, Barinka C, Tykvart J, Šácha P, Konvalinka J. Prostate-specific membrane antigen and its truncated form PSM'. *Prostate.* 2009;69:471-9
- Schmittgen TD, Teske S, Vessella RL, True LD, Zakrajsek BA. Expression of prostate specific membrane antigen and three alternatively spliced variants of PSMA in prostate cancer patients. *International Journal of Cancer.* 2003;107:323-9
- Cao K-Y, Xu L, Zhang D-M, Zhang X-M, Zhang T, He X, et al. New alternatively spliced variant of prostate-specific membrane antigen PSM-E suppresses the proliferation, migration and

- invasiveness of prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2012;40:1977-85
18. Loy CJ, Sim KS, Yong EL. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:4562-7
 19. Vaz S, Hadaschik B, Gabriel M, Herrmann K, Eiber M, Costa D. Influence of androgen deprivation therapy on PSMA expression and PSMA-ligand PET imaging of prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2020;47:9-15
 20. Isbarn H, Boccon-Gibod L, Carroll PR, Montorsi F, Schulman C, Smith MR, et al. Androgen deprivation therapy for the treatment of prostate cancer: consider both benefits and risks. *Eur Urol.* 2009;55:62-75
 21. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:34-45
 22. Saraon P, Drabovich AP, Jarvi KA, Diamandis EP. Mechanisms of Androgen-Independent Prostate Cancer. *EJIFCC.* 2014;25:42-54
 23. Bansal M, Singh N, Pal S, Dev I, Ansari KM. Chapter Three - Chemopreventive Role of Dietary Phytochemicals in Colorectal Cancer. In: Fishbein JC, Heilman JM, editors. *Advances in Molecular Toxicology* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2021 Jun 12]. p. 69-121. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044464199100004X>
 24. Zempleni J, Suttie JW #1934#, Gregory JF, Stover PJ #1964#. *Handbook of vitamins.* Boca Raton, Florida: CRC Press; 2015
 25. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metab.* 2017;25:27-42
 26. Holm J, Hansen SI. Characterization of soluble folate receptors (folate binding proteins) in humans. Biological roles and clinical potentials in infection and malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2020;1868:140466
 27. Yao V, Berkman CE, Choi JK, O'Keefe DS, Bacich DJ. Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid: PSMA Increases Folate Uptake and Proliferation. *Prostate.* 2010;70:305-16
 28. Slusher BS, Rojas C, Coyle JT. Chapter 367 - Glutamate Carboxypeptidase II. In: Rawlings ND, Salvesen G, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)* [Internet]. Academic Press; 2013 [cited 2021 Jun 14]. p. 1620-7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123822192003689>
 29. Yelamanchi SD, Jayaram S, Thomas JK, Gundimeda S, Khan AA, Singhal A, et al. A pathway map of glutamate metabolism. *J Cell Commun Signal.* 2016;10:69-75
 30. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, et al. *Glutamate Receptors.* Neuroscience 2nd edition [Internet]. 2001 [cited 2021 Jun 17]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10802/>
 31. Hu JH, Yang N, Ma YH, Jiang J, Zhang JF, Fei J, et al. Identification of glutamate receptors and transporters in mouse and human sperm. *J Androl.* 2004;25:140-6
 32. Storto M, Sallèse M, Salvatore L, Poulet R, Condorelli DF, Dell'Albani P, et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat and human testis. *J Endocrinol.* 2001;170:71-8
 33. Kaittanis C, Andreou C, Hieronymus H, Mao N, Foss CA, Eiber M, et al. Prostate-specific membrane antigen cleavage of vitamin B9 stimulates oncogenic signaling through metabotropic glutamate receptors. *J Exp Med.* 2018;215:159-75
 34. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2020;20:74-88
 35. Alberts B. *Molecular biology of the cell.* Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015. 1 p
 36. Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, Chamie K, Siddiqui S, Mudryj MM, et al. Nuclear vs cytoplasmic localization of Filamin A in prostate cancer: immunohistochemical correlation with metastases. *Clin Cancer Res.* 2009;15:788-96
 37. Peverelli E, Giardino E, Vitali E, Treppiedi D, Lania AG, Mantovani G. Filamin A in somatostatin and dopamine receptor regulation in pituitary and the role of cAMP/PKA dependent phosphorylation. *Horm Metab Res.* 2014;46:845-53
 38. Kim S-W, Roh J, Park C-S. Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. *J Pathol Transl Med.* 2016;50:411-8
 39. Sjørup AH. *Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Sixth Edition.* :218
 40. O'Hurley G, Sjöstedt E, Rahman A, Li B, Kampf C, Pontén F, et al. Garbage in, garbage out: A critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol.* 2014;8:783-98
 41. Osborne JR, Akhtar NH, Vallabhajosula S, Anand A, Deh K, Tagawa ST. Prostate-specific membrane antigen-

- based imaging. *Urol Oncol*. 2013;31:144-54
42. Han M, Partin AW. Current clinical applications of the ¹¹¹In-capromab pendetide scan (ProstaScint® Scan, Cyt-356). *Rev Urol*. 2001;3:165-71
43. Pastorino S, Riondato M, Uccelli L, Giovacchini G, Giovannini E, Duce V, et al. Toward the discovery and development of PSMA targeted inhibitors for nuclear medicine applications. *Curr Radiopharm*. 2020;13:63-79
44. Will L, Sonni I, Kopka K, Kratochwil C, Giesel FL, Haberkorn U. Radiolabeled prostate-specific membrane antigen small-molecule inhibitors. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2017;61:168-80
45. Cimadamore A, Cheng M, Santoni M, Lopez-Beltran A, Battelli N, Massari F, et al. New Prostate Cancer Targets for Diagnosis, Imaging, and Therapy: Focus on Prostate-Specific Membrane Antigen. *Front Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 24];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00653/full>
46. Rupp NJ, Umbricht CA, Pizzuto DA, Lenggenhager D, Töpfer A, Müller J, et al. First clinicopathologic evidence of a non-PSMA-related uptake mechanism for ⁶⁸Ga-PSMA-11 in salivary glands. *J Nucl Med*. 2019;60:1270-6
47. Tönnemann R, Meyer PT, Eder M, Baranski A-C. [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 Salivary gland uptake characterized by quantitative in vitro autoradiography. *Pharmaceuticals* (Basel). 2019;12:18
48. Kuten J, Fahoum I, Savin Z, Shamni O, Gitstein G, Hershkovitz D, et al. Head-to-Head Comparison of ⁶⁸Ga-PSMA-11 with ¹⁸F-PSMA-1007 PET/CT in staging prostate cancer using histopathology and immunohistochemical analysis as a reference standard. *J Nucl Med*. 2020;61:527-32
49. New Strategies in Prostate Cancer: Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) ligands for diagnosis and therapy. *Clinical Cancer Research* [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/1/9.long>