

Woord vooraf

In het kader van de opleiding tot industrieel ingenieur in de biochemie dient elke student een masterproef uit te voeren. Na aanduiden van 5 interessante stageplaatsen ben ik terecht gekomen bij Epsilon Biotech in Zonhoven, dit was een van mijn 2 eerste keuzes. Het onderwerp waar mijn stage rond draaide was het opsporen van nagalase en de ontwikkeling van een methode hiervoor. Omdat ik sinds lang een brede wetenschappelijke interesse heb en ik geïntrigeerd ben door de werking van het menselijk lichaam sprak dit onderwerp mij ten zeerste aan. Met mijn onderzoek hoop ik een klein steentje bij te dragen tot de wetenschappelijke hiaten omtrent nagalase.

Vergeleken met mijn stage in mijn bacheloropleiding was dit toch een andere invalshoek. Waar ik tijdens mijn opleiding tot laboratoriumtechnoloog terecht kwam in een kwaliteislabo, speelde deze stage zich volledig af binnen het R&D gebeuren. Dit is wel een tak van de wetenschap die mij ligt, hoewel het niet altijd even makkelijk is. Tijdens mijn masterproef was er ook even een periode waarin er steeds problemen de kop op staken en dan heb je als student wel doorzettingsvermogen nodig. Achteraf is het des te leuker als alles in de juiste plooi valt en dit geeft toch een zekere voldoening. Uiteraard heb ik dit niet allemaal alleen gedaan. Daarom zou ik in de eerste plaats mijn externe promotoren, dhr. Eugene Bosmans en ing. Bart Thewissen willen bedanken. Zij hebben mij uitstekend begeleid gedurende deze periode en ik kon steeds voor alles bij hen terecht. Ook mijn interne promotor, ing. Liesbet Pauls wil ik bedanken, voor het kritisch bekijken van mijn onderzoek en voor de ondersteuning tijdens het schrijven van mijn thesis. Ook dr. Jeroen Lievens zou ik willen bedanken voor de snelle en bruikbare feedback over het schrijven tijdens deze masterproef. Uiteraard mag ik ook mijn familie en vriendin Silke niet vergeten te bedanken. Zoals gedurende mijn volledige opleiding, hebben ze mij ook tijdens deze stage gesteund en telkens ondersteuning geboden waar ze konden.

Inhoudsopgave

WOORD VOORAF	1
LIJST VAN TABELLEN.....	5
LIJST VAN FIGUREN	7
VERKLARENDE WOORDENLIJST	9
ABSTRACT	11
SUMMARY	13
1 INLEIDING.....	15
1.1 Situering	15
1.2 Probleemstelling.....	15
1.3 Doelstellingen.....	16
1.4 Methode	16
2 ENZYMATISCHE WERKING VAN NAGALASE.....	19
3 GC-GLOBULINE	23
4 PATHOLOGIEËN	27
4.1 Ziekte van Schindler & Kanzaki.....	27
4.2 Ziekte van Fabry.....	27
4.3 Influenza	28
4.4 Humaan immunodeficiëntievirus (hiv)	28
4.5 Autisme	28
4.6 Alcohol.....	29
4.7 Kanker.....	30
5 MATERIAAL EN METHODE	31
5.1 Materiaal.....	31
5.1.1 Victor X4 Multilabel Plate Reader	31

5.1.2	<i>Capture</i> antilichaam	31
5.1.3	Substraat	31
5.2	Methode	33
5.2.1	ROC-curve.....	33
5.2.2	Methodes voor de bepaling van nagalaseactiviteit.....	36
5.2.2.1	<i>Enzyme-linked fluoroimmunoassay</i> (ELFIA).....	36
5.2.2.2	<i>Fluorescent assay</i> (FA)	37
5.2.3	Concentratiebepaling nagalase in humaan serum.....	38
6	RESULTATEN	39
6.1	Concentratiebepaling nagalase in humaan serum.....	39
6.2	ELFIA.....	40
6.3	Fluorescent assay (FA).....	41
6.3.1	Alcohol	42
6.3.2	Prostaat­kanker	45
6.3.3	Overige carcinomen	48
6.3.3.1	Borst­kanker	48
6.3.3.2	Pancreas­kanker	50
6.3.3.3	Ovarium­kanker	52
7	KOSTENANALYSE	55
8	BESLUIT	57
	BIBLIOGRAFIE	59
	BIJLAGEN	63

Lijst van tabellen

TABEL 1: GC-GLOBULINE: GENOTYPE & FENOTYPE	24
TABEL 2: GC-GLOBULINE: FENOTYPES & HUN STRUCTUREN.....	25
TABEL 3: INHOUD 96-WELL PLAAT ELFIA	40
TABEL 4: VERDUNNINGSREEKS SERUM.....	41
TABEL 5: INHOUD 96-WELL PLAAT FA	42
TABEL 6: OVERZICHT RESULTATEN FA ALCOHOLMISBRUIK	42
TABEL 7: GEGEVENS ROC-CURVE NAGALASE EN ALCOHOLMISBRUIK	44
TABEL 8: OVERZICHT RESULTATEN FA PROSTAATKANKER	45
TABEL 9: GEGEVENS ROC-CURVE NAGALASE EN PROSTAATKANKER	47
TABEL 10: GEGEVENS ROC-CURVE NAGALASE EN PROSTAATKANKER WBC <9000	48
TABEL 11: OVERZICHT RESULTATEN FA BORSTKANKER.....	48
TABEL 12: GEGEVENS ROC-CURVE NAGALASE EN BORSTKANKER	50
TABEL 13: OVERZICHT RESULTATEN FA PANCREASKANKER.....	50
TABEL 14: GEGEVENS ROC-CURVE NAGALASE EN PANCREASKANKER	52
TABEL 15: OVERZICHT RESULTATEN FA OVARIUMKANKER	53
TABEL 16: GEGEVENS ROC-CURVE NAGALASE EN OVARIUMKANKER	54
TABEL 17: KOSTENANALYSE FA-TEST	55

Lijst van figuren

FIGUUR 1: DEGLYCOSYLATIE VAN GC-GLOBULINE (NAGASAWA, ET AL., 2005).....	20
FIGUUR 2: VORMING VAN GC-MAF EN INVLOED VAN NAGALASE (YAMAMOTO , SUYAMA , & YAMAMOTO , 2008).....	21
FIGUUR 3: DE AZ-SEQUENTIE VAN GC-GLOBULINE (NAGASAWA, ET AL., 2005)	23
FIGUUR 4: ROC-CURVE VOOR NAGALASE BIJ PATIËNTEN MET EEN ALCOHOLVERSLAVING (ZOGA, ET AL., 2016).....	29
FIGUUR 5: DALING VAN DE NAGALASEACTIVITEIT NA BEHANDELING MET GC-MAF (THYER , ET AL., 2013).....	30
FIGUUR 6: VICTOR X4 MULTILABEL PLATE READER VAN PERKIN ELMER (MIDSCI, 2015).....	31
FIGUUR 7: REACTIE VAN NAGALASE EN 4-METHYLUMBELLIFERYL-A-N-ACETYL-D-GALACTOSAMINIDE	32
FIGUUR 8: STRUCTUUR VAN 4-METHYLUMBELLIFERYL IN NEUTRAAL (A), ZUUR (B) EN BASISCH (C) MIDDEN (AL-KADY , AHMED , GABER , HUSSEIN , & EBEID , 2011).....	32
FIGUUR 9: EXCITATIE EN FLUORESCENTIE SPECTRA VAN 4-METHYLUMBELLIFERYL BIJ VERSCHILLENDE PH'S (AL-KADY , AHMED , GABER , HUSSEIN , & EBEID , 2011).....	33
FIGUUR 10: GEcombineerde GAUSSCURVES VAN 2 ONDERZOCHE CATEGORIEËN MET IN Y-AS HET SIGNAAL EN IN X-AS DE ONDERZOCHE PARAMETER (ZWEIG & CAMPBELL, 1993).....	34
FIGUUR 11: VERHOUDING 4 OPPERVLAKKEN GEcombineerde GAUSSCURVES	34
FIGUUR 12: OPBOUW ROC-CURVE (NEKO, 2005).....	35
FIGUUR 13: OVERZICHT ELFIA	37
FIGUUR 14: OVERZICHT FA	38
FIGUUR 15: IJKCURVE VAN NAGALASECONCENTRATIE IN SERUM	39
FIGUUR 16: IJKLIJN STANDAARD ELFIA.....	40
FIGUUR 17: IJKLIJN SERUM FA	41
FIGUUR 18: ROC-CURVE ONDSCHIED TUSSEN ALCOHOLMISBRUIK EN CONTROLEGROEP	43
FIGUUR 19: BOXPLOT NAGALASE EN ALCOHOLMISBRUIK (0 = NORMALE DRINKERS, 1 = ALCOHOLMISBRUIK)	44
FIGUUR 20: ROC-CURVE ONDSCHIED PROSTAATKANKER EN CONTROLEGROEP	46
FIGUUR 21: ROC-CURVE ONDSCHIED PROSTAATKANKER EN CONTROLEGROEP WBC <9000.....	47
FIGUUR 22: ROC-CURVE ONDSCHIED BORSTKANKER EN CONTROLEGROEP	49
FIGUUR 23: ROC-CURVE ONDSCHIED PANCREASKANKER EN CONTROLEGROEP	52
FIGUUR 24: ROC-CURVE ONDSCHIED OVARIUMKANKER EN CONTROLEGROEP	54
FIGUUR 25: KOSTENVERDELING PER WELL FA-TEST	55

Verklarende woordenlijst

AL	antilichaam
AUC	<i>area under the curve</i>
AZ	aminozuur
CA	<i>cancer antigen</i>
CA 1.25	ovariumkankermerker
CA 1.53	borstkankermerker
CA 1.99	pancreaskankermerker
cv	variatiecoëfficiënt
DBP	vitamine D-bindend proteïne
ELFIA	<i>enzyme-linked fluoroimmunoassay</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FA	<i>fluorimetric assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FN	<i>false negative</i>
FP	<i>false positive</i>
GalNAc	N-acetylgalactosamine
Gb3	globotriaosylceramide
GLA	galactosidase
HA	hemagglutinine
hiv	humaan immunodeficientievirus
kDa	kilodalton
MAF	macrofaagactiverende factor
NAGA	α -N-acetylgalactosaminidase of nagalase
nm	nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PSA	prostaat specifiek antigeen
PVC	polyvinylchloride
ROC	receiver operating characteristic
TN	<i>true negative</i>
TP	<i>true positive</i>
WBC	<i>white bloodcell count</i>

Abstract

Epsilon Biotech in Zonhoven ontwikkelt methodes om nagalaseactiviteit in humaan serum te bepalen. Verschillende pathologieën zijn gerelateerd aan nagalase. Er zijn artikels die nagalase linken aan alcoholmisbruik en prostaatkanker. Hoofddoel is dus een efficiënte meetmethode te ontwikkelen voor nagalase, zo kostefficiënt mogelijk met korte analyseduur, waarna patiëntensera op nagalaseactiviteit getest worden.

Twee methoden werden getest om de nagalaseactiviteit te bepalen. De eerste is een *enzyme-linked fluoroimmunoassay* (ELFIA), waarbij nagalase uit serum gevangen wordt met antilichamen, specifiek tegen het nagalase. Na wassen en toevoegen van fluorescerend substraat wordt via fluorescentie de nagalaseactiviteit gemeten. Omdat deze methode niet de gewenste resultaten opleverde wordt er overgestapt op een *fluorimetric assay* (FA). Hierbij worden serum en fluorescent substraat rechtstreeks samengevoegd en het fluorescentie signaal na 2 uur gemeten.

De FA-methode bepaalt de nagalaseactiviteit in serum reproduceerbaar, met beperkte analyseduur en lage kost. De nagalaseactiviteitsbepaling via FA kan worden toegepast om pathologieën zoals overmatig alcoholgebruik en kankers op te volgen. In tegenstelling tot literatuurgegevens blijkt nagalase ongeschikt voor prostaatkankermonitoring. Voor alcoholmisbruik en het opvolgen van andere kankers via de tumormerkers zoals CA 1.99 (pancreas), CA 1.53 (borst) en CA 1.25 (ovarium) is er statistisch een significant verband tussen de nagalaseactiviteit en de ernst van de aandoening.

Summary

Epsilon Biotech develops methods to determine nagalase activity in serum. Nagalase (NAGA) activity is affected in multiple pathologies. Many articles are linking NAGA with alcohol abuse and prostate cancer. Main purpose of this research is to develop an efficient detection of NAGA without superfluous costs and with a short turn around time. This NAGA test will be evaluated with panels of patient sera.

Two methods are tested to determine the NAGA activity. The first method is an enzyme-linked fluoroimmunoassay (ELFIA), wherein polyclonal anti-NAGA antibodies are coated on a microwell plate in order to capture the nagalase from serum. After a washing step, a fluorescent substrate is added, which generates a fluorescent signal proportional to the NAGA activity. This method didn't provide the expected result and therefore was replaced by a fluorimetric assay (FA) in which serum and substrate are mixed directly for 2 hours where after fluorescence is measured.

Using the FA-method, the NAGA activity can be reproducibly determined with short turn around time and at low cost. This NAGA activity test through FA can be used in different diseases such as alcohol abuse and cancer therapy monitoring. Contrary to the literature the FA-method does not provide satisfactory results for prostate cancer monitoring, but it shows statistically very significant correlation with alcohol abuse and with the follow up for several cancers through tumor markers such as CA 1.99 (Pancreas), CA 1.53 (Breast) and CA 1.25 (ovarium).

1 Inleiding

1.1 Situering

Deze masterproef vindt plaats bij het bedrijf Epsilon Biotech te Zonhoven. Dit is een kleinschalig bedrijf dat hoofdzakelijk in opdracht van andere bedrijven en onderzoeksinstituten biochemische analyses uitvoert. Deze opdrachtgevers houden zich voornamelijk bezig met de klinische aspecten en besteden het analytisch labowerk uit aan derden. De technieken die bij Epsilon Biotech vooral aan bod komen zijn flowcytometrie en hieraan gekoppeld *fluorescence-activated cell sorting* (FACS), fluorimetrie, turbidimetrie en ook *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Flowcytometrie gebruikt laserlicht om cellen in een heterogene vloeistof te tellen en/of te karakteriseren (Jahan-Tigh, Ryan, Obermoser, & Schwarzenberger, 2012). FACS is een afgeleide techniek van flowcytometrie (Cheng, Wu, Cheng, & Liu, 2017). Flowcytometrie maakt onderscheid tussen verschillende soorten cellen en telt ze in één simultane meting. Fluorimetrie werkt via een enzym-substraat omzetting, die een fluorescent signaal genereert. Dit signaal wordt gebruikt om de concentratie van een component in het staal te bepalen (Engelborghs & Visser, 2014). Aan de hand van turbidimetrie, of het meten van de troebelheid van een oplossing na toevoegen van een antigeen specifieke antistof, wordt het gehalte van een chemisch bestanddeel in een staal bepaald (Strzelak & Koncki, 2013). ELISA tenslotte is een analysetechniek die macromoleculen zoals eiwitten meet in allerlei biologische monsters. Dit gebeurt op basis van antilichaam-antigeninteracties. Fluorescentie kan als detectiemethode gebruikt worden in ELISA (Pita, Cui, Gaikwad, Katz, & Sokolov, 2008).

1.2 Probleemstelling

Het enzym nagalase (α -N-acetylgalactosaminidase of NAGA) wordt geproduceerd door humane cellen. Het is een cellulair lysosomaal enzym dat celrestanten afkomstig van necrotische cellen opruimt (Yamamoto, Suyama, Nakazato, Yamamoto, & Koga, 2008). Nagalase staat in voor de afbraak van glycolipiden en glycopeptiden, deze bevinden zich in het celmembraan van de cel (Tomasic, Metcalf, Guce, Clark, & Garman, 2010). In verband met nagalase zijn er twee mogelijke problemen: deficiëntie en overexpressie. Deficiëntie van nagalase kan leiden tot de ziekte van Schindler en Kanzaki. Bij de ziekte van Schindler en Kanzaki zorgt een daling van de enzymatische activiteit van nagalase voor een accumulatie van glycolipiden en glycopeptiden, wat zich uit in neurologische en andere stapelingspathologieën. Deze ziekte wordt veroorzaakt door mutaties in het NAGA-gen (Sarbu, Munteanu, Dehelean, Petrescu, Peter-Katalinic, & Zamfir, 2015).

Een andere stapelingsziekte is de ziekte van Fabry. Hierbij is er sprake van mutaties in het galactosidasegen (GLA-gen). De resulterende deficiëntie van de galactosidase-activiteit zorgt in de weefsels voor opstapeling van glycopeptiden en oligosacchariden die eindstandig galactose bevatten. Deze glycopeptiden worden gedetecteerd in het bloedserum en de urine (Tomasic, Metcalf, Guce, Clark, & Garman, 2010).

Er bestaat een verband tussen beide genen (NAGA en GLA): door een puntmutatie kan de nagalaseactiviteit omgezet worden in een galactosidaseactiviteit en omgekeerd. Over de overexpressie van nagalase zijn een reeks artikels verschenen in verband met kanker. Hierin wordt verondersteld dat kankercellen het nagalase overproduceren (Yamamoto, Suyama, Nakazato, Yamamoto, & Koga, 2008). Er zijn echter onderzoekers die dit in twijfel trekken, dus verder onderzoek is nodig. Indien de planning van deze masterproef het toelaat, wordt deze hypothese getest. De overexpressie van nagalase zou ook voorkomen bij cellen die geïnfecteerd zijn door bepaalde virussen, zoals het hiv-virus (Yamamoto & Urade, 2005). Indien bovenstaande hypothesen juist zijn, kan in de toekomst het effect van specifieke therapie snel opgevolgd worden bij bepaalde aandoeningen aan de hand van nagalasemetingen.

1.3 Doelstellingen

De theoretische achtergrond om nagalaseactiviteit specifiek te meten in serum van patiënten is reeds enige tijd gekend. De oorspronkelijke meting van nagalase gebeurde via een colorimetrische rechtstreekse methode, waarbij het substraat rechtstreeks werd toegevoegd aan het serum, leverde echter niet het gewenste resultaat door gebrek aan gevoeligheid van de bepaling en de aanwezigheid van inhibitoren van het nagalase. In deze masterproef wordt getracht een FA-test te ontwikkelen om de nagalaseactiviteit in het serum te bepalen. FA staat voor *fluorimetric assay* en is een variante van ELISA. Het is de bedoeling om deze test zo accuraat en zo economisch efficiënt mogelijk te maken met een zo kort mogelijke analyseduur en zo weinig mogelijk kosten zodat de test voor grootschalige evaluaties op panels van patiëntensera kan toegepast worden, om de rol van nagalase in verschillende pathologieën te evalueren.

1.4 Methode

Om de doelstelling te bereiken wordt gestart met de selectie van een juiste methode. Nagalase werd in het verleden gemeten in patiëntensera via de omzetting van 4-nitrophenyl N-acetyl- α -D-galactosaminide. Deze meting, waarbij het substraat rechtstreeks toegevoegd werd aan het serum, leverde echter niet het gewenste resultaat. Waarschijnlijk was deze methode die wel bruikbaar was voor bacterieel nagalase niet geschikt voor cellulair nagalase, waarschijnlijk wegens een te lage gevoeligheid. Dit probleem werd omzeild door het nagalase in een grotere hoeveelheid serum neer te slaan met ammoniumsulfaat en het nagalase in de neerslag te meten, wat de methode te omslachtig maakt om grootschalig toegepast te worden. Om de neerslag procedure te vermijden en de bepaling gevoeliger te maken werd een *enzyme-linked fluoroimmunoassay* (ELFIA) methode getest. Deze methode bleek niet bruikbaar wegens onvoldoende reproduceer en bovendien te duur wegens de hoge kost van het *capture* antilichaam.

Recent werd als alternatief voor de colorimetrische nagalasebepaling een ELISA (USCN Life Science inc E97574Hu) op de markt gebracht die toe laat de concentratie van nagalase in serum te meten in een meetbereik van 0,312 tot 20 ng/ml. Deze ELISA-kit werd ter evaluatie aangekocht en de nagalaseconcentratie van onze serumpool, waarvan de nagalaseactiviteit gekend is, werd ermee bepaald. Er mag verwacht worden dat deze ELISA-kit de nagalaseconcentratie voldoende nauwkeurig kan bepalen, maar aangezien de volledig beschikbare literatuur enkel nagalaseactiviteit vermeld en geen concentratie, kan de concentratie niet gebruikt worden om resultaten met reeds uitgevoerde studies te vergelijken. Bovendien is de ELISA-kit erg kostelijk, daarom wordt er verder gewerkt met activiteit. De concentratiebepaling is ook niet vergelijkbaar met de activiteitsbepaling, omdat bij de concentratiebepaling zowel het actief als het inactief nagalase wordt gemeten.

Een laatste mogelijke methode om de nagalaseactiviteit te meten is het ontwikkelen van een *fluorimetric assay* (FA). De FA bleek uiteindelijk de geschikte methode omdat er een stabiel verband werd gevonden tussen gekende nagalase hoeveelheden in een serumpool en de bekomen fluorescente signalen, die reproduceerbaar waren en die bovendien toelieten van een lineaire verdunningscurve op te stellen, zodat dit lineair verband voor een betrouwbare ijking van de methode gebruikt kan worden.

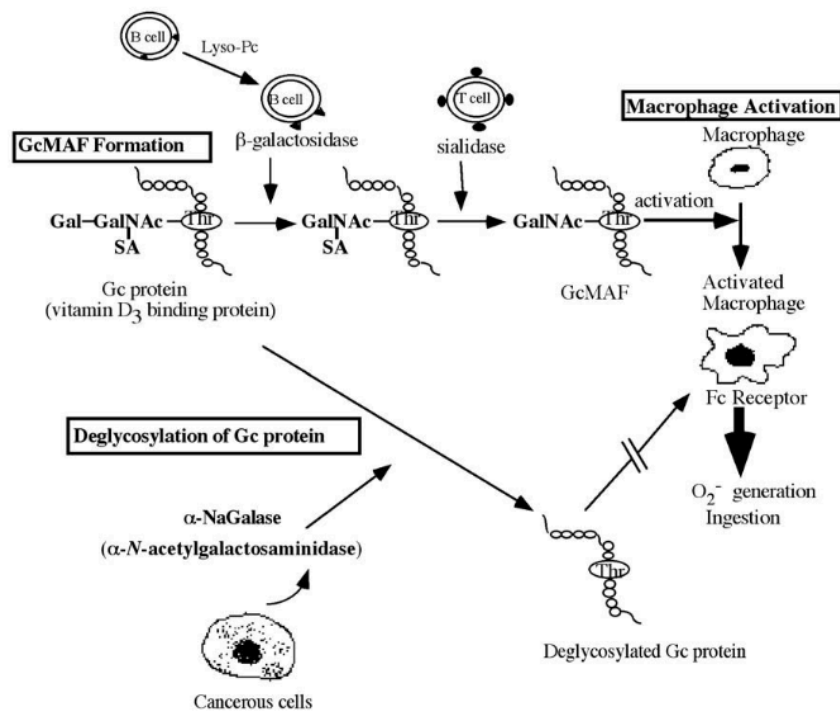
De fluorescentie wordt gemeten met de Victor X4 Multilabel Plate Reader van Perkin Elmer. Dit toestel bevat vier meetfuncties, waaronder fluorescentiemeting. Hierbij wordt licht met een bepaalde golflengte uitgezonden naar het staal. Het fluorescent deel van het substraatmolecule absorbeert dit licht. De elektronen van het molecule raken in geëxciteerde toestand en bij het terugvallen naar de grondtoestand zenden ze licht uit van een hogere, specifieke golflengte. Het is bij deze laatste golflengte dat gedetecteerd wordt. Vervolgens wordt de procedure aangepast om een zo efficiënt mogelijk proces te verkrijgen. De kosten voor deze test kunnen beperkt worden door de incubatieduur te verkleinen en door de hoeveelheid substraat te beperken.

2 Enzymatische werking van nagalase

Het enzym α -N-acetylgalactosaminidase (nagalase) is een glycoside hydrolase, aanwezig in de lysosomen van onder andere dierlijke cellen, waar het instaat voor de afbraak van allerlei geglycosyleerd necrotisch materiaal. Genetische deficiëntie en/of mutatie van nagalase leidt tot stapelingsziekten. Overexpressie kan dan weer gebruikt worden door allerlei kankercellen om de aangeboren immuunafweer van het lichaam te omzeilen. Het enzym deglycosyleert namelijk het vitamine D-bindend proteïne (Gc-globuline of Gc-proteïne), een sleuteleiwit in de aangeboren immuunafweer.

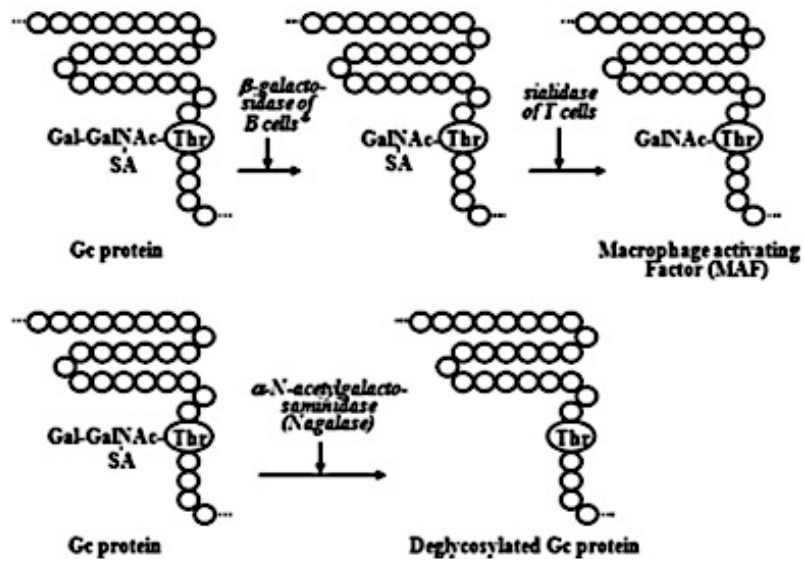
Het Gc-globuline bevat 3 suiker- of suikerderivaatresten en is de precursor van de immunomodulerende macrofaagactiverende factor (Gc-MAF). Door complete deglycosylatie kan het Gc-globuline niet meer omgezet worden in de macrofaagactiverende factor (Nagasawa, et al., 2005). Zoals te zien op Figuur 1 wordt Gc-MAF geproduceerd uit Gc-globuline door het afsplitsen van galactose en siaalzuur. De derde suikerrest, N-acetylgalactosamine (GalNAc), blijft gebonden. Dit proces vindt plaats in de lymfocyten (Zoga, et al., 2016). Omtrent de structuur van Gc-MAF is sinds kort onduidelijkheid gerezen. In een recent artikel wordt geopperd dat galactose toch gebonden blijft aan GalNAc in Gc-MAF. Er is dus verder onderzoek nodig om de structuur van Gc-MAF op te helderen (Borges & Rehder, 2016).

Nagalase katalyseert de afsplitsing van de derde suikerrest GalNAc, hetgeen resulteert in een volledige deglycosylatie van het Gc-globuline waardoor de Gc-MAF-synthese wordt geïnhibeerd. Gc-MAF beïnvloedt het immuunsysteem, het speelt een rol in verschillende ziekten door het verbeteren van de immunrespons en de toxiciteit van macrofagen. Gc-MAF is dus een immuunmodulator die tussenkomt in de aangeboren afweer (Zoga, et al., 2016).



Figuur 1: Deglycosylatie van Gc-globuline (Nagasawa, et al., 2005)

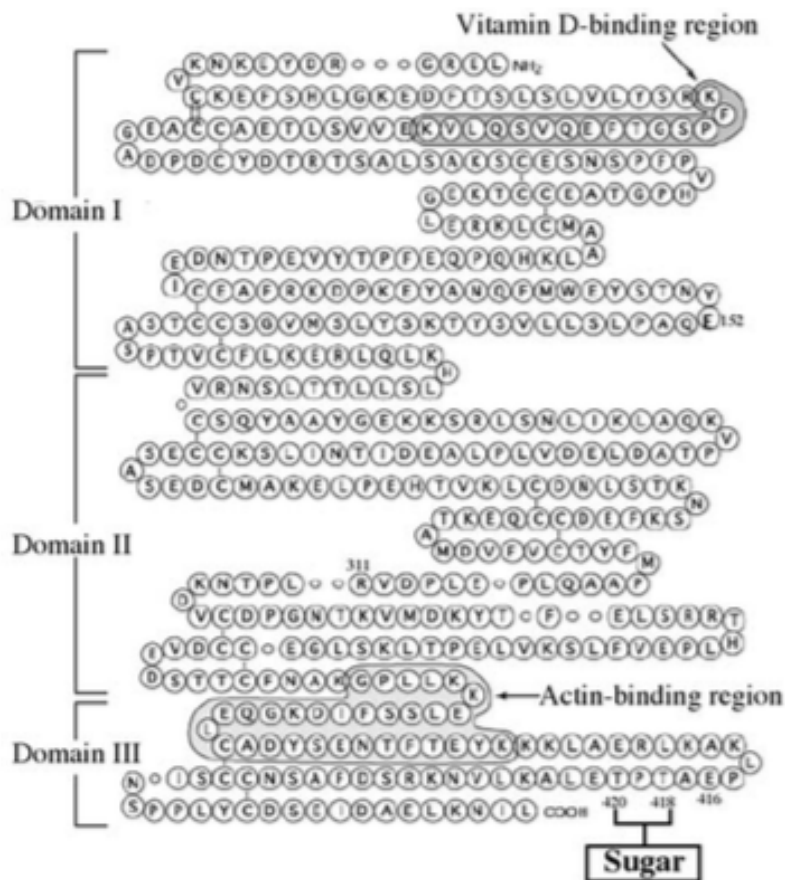
Nagalase is een lysosomaal enzym dat de O-glycosidische binding tussen α -N-acetylgalactosamine en threonine van het Gc-globuline splitst in mucin-type glycoproteïnen, dit is te zien op Figuur 2. Humaan nagalase staat gecodeerd op chromosoom 4. Een deficiëntie van de nagalaseactiviteit kan bij mensen verschillende klinische aandoeningen veroorzaken zoals de ziekte van Schindler en Kanzaki. Hoewel endo-nagalase teruggevonden is in bacteriën, is in de mens enkel exo-nagalase van nature aanwezig (Mohamad, Nagasawa, Uto, & Hori, 2002). Zoals eerder te zien in Figuur 1 stelde Nagasawa et al. (2005) een macrofaagactivatie cascade voor waar het Gc-globuline deelneemt als precursor van Gc-MAF. Er werd dus aangetoond dat Gc-MAF werd afgeleid van het Gc-globuline door stapsgewijze hydrolyse van het suikergedeelte. Zoals blijkt uit Figuur 2 wordt eerst een galactose afgesplitst, gekatalyseerd door een membraangebonden galactosidase van B-cellen. Vervolgens wordt het siaalzuuresidu verwijderd door een membraangebonden sialidase (neuraminidase) van T-cellen (Nagasawa, et al., 2005).



Figuur 2: Vorming van Gc-MAF en invloed van nagalase (Yamamoto , Suyama , & Yamamoto , 2008)

3 Gc-globuline

Het vitamine D-bindend proteïne (DBP) of Gc-globuline is het belangrijkste transportmolecule voor vitamine D in de bloedbaan. DBP wordt vooral gesecreteerd door de lever, heeft een moleculair gewicht van 52-59 kDa en bestaat uit 458 aminozuren (AZ). De DBP-concentratie in bloedserum bedraagt 300-600 µg/ml. Een partiële deglycosylatie van DBP vormt DBP-MAF (of Gc-MAF). Volledig gedeglycosyleerd Gc-globuline kan niet worden omgevormd naar Gc-MAF, wat leidt tot onderdrukking van het immuunsysteem (Gregory, et al., 2010). De primaire structuur van Gc-globuline is te zien in Figuur 3 (Nagasawa, et al., 2005). Elk aminozuur wordt voorgesteld door een letter.



Figuur 3: De AZ-sequentie van Gc-globuline (Nagasawa, et al., 2005)

Gc-globuline is een glycoproteïne met een zijketen samengesteld uit N-acetylgalactosamine met een galactose- en een siaalzuuruiteinde. Via N-acetylgalactosamine zit de suikergroep gebonden aan de zijketen van threonine (AZ nr. 420). De binding met galactose en met siaalzuur wordt gehydrolyseerd door het induceerbaar membraangebonden β-galactosidase van B-cellen en door het membraangebonden neuraminidase van T-cellen. Zo wordt het proteïne met N-acetylglucosamine als resterend suikerdeel gevormd, een macrofaagactiverende factor. Gc-globuline wordt tijdens een posttranslationele deglycosylatie omgezet tot Gc-MAF.

Volledige deglycosylering van het Gc-globuline zorgt voor een vertraagde macrofaagactivatie. Macrofagen zijn de grootste fagocytische en antigeen presenterende cellen. Aangezien macrofaagactivatie voor fagocytose en antigeenpresentatie aan B- en T-lymfocyten de eerste onmisbare stappen zijn in de ontwikkeling van zowel cellulaire als humorale afweer, kan een verstoorde macrofaagactivatie leiden tot onderdrukking van het immuunsysteem (Yamamoto, Suyama, Nakazato, Yamamoto, & Koga, 2008).

Gc-globuline is gecodeerd op het humaan chromosoom 4, op band 4q11-q13. Er zijn 3 allelen (Gc*2, Gc*1F en Gc*1S) en meer dan 120 varianten van het Gc-globuline in de menselijke populatie. De varianten zijn onderverdeeld in 6 genotypen, waaronder 3 homozygoten: Gc1F-1F, Gc1S-1S en Gc2-2. Deze Gc-globulines kunnen in 4 AZ (nr. 152, 311, 416 en 420) verschillen, zie in Tabel 1 (Abbas, et al., 2008).

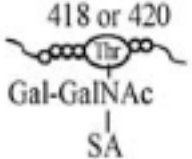
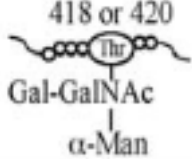
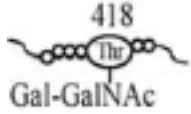
Tabel 1: Gc-globuline: genotype & fenotype

Allel	Aminozuur positie			
	152	311	416	420
Gc*1F	GAA	AGA	GAT	ACG
Gc*1S	GAA	AGA	GAG	ACG
Gc*2	GGA	GAG	GAT	AAG

Fenotype	Aminozuur positie			
	152	311	416	420
Gc1F	Glu	Arg	Asp	Thr
Gc1S	Glu	Arg	Glu	Thr
Gc2	Gly	Glu	Asp	Lys

In het Gc-genotype is er 1 base verschil tussen Gc1S en Gc1F, waardoor ze in 1 AZ (nr. 416) verschillen en er is zes basen verschil tussen Gc1S en Gc2. Humaan Gc-globuline bevat 3 suikerresiduen. Zoals Tabel 2 toont, bevat Gc1F een zijketen van N-acetylgalactosamine (GalNAc) dat gebonden zit aan het proteïne, aan galactose en aan siaalzuur (in Gc1F) of aan mannose (Gc1S). Gc2 heeft een korter glycosylatiepatroon met een kern van GalNAc gelinkt aan een terminaal galactosedeel (Ohkura, Nagasawa, Uto, Okamura, Murakami, & Hori, 2006).

Tabel 2: Gc-globuline: fenotypes & hun structuren

Gc-type	Gc1F	Gc1S	Gc2
Oligosaccharide	 <p>418 or 420 Thr Gal-GalNAc SA</p>	 <p>418 or 420 Thr Gal-GalNAc α-Man</p>	 <p>418 Thr Gal-GalNAc</p>
<p>Gal: galactose; GalNAc: N-acetylgalactosamine; SA: siaalzuur; α-Man: α-mannose</p>			

4 Pathologieën

4.1 Ziekte van Schindler & Kanzaki

De ziekte van Schindler is een stofwisselingsziekte die ontstaat door problemen met de lysosomen, de opruimers van een cel. Mutaties in het NAGA-gen produceren een deficiënt lysosomaal enzym, nagalase. Dit leidt tot een beschadigde opbouw van glycosfingolipiden. De accumulatie van deze glycosfingolipiden veroorzaakt na verloop van tijd neurologische schade (Kelly, 2013). Het is een autosomale aandoening die dus een verminderde activiteit van het α -N-acetylgalactosaminidase veroorzaakt. Het enzymatisch defect leidt tot cellulaire accumulatie en verhoogde urinaire excretie van glycopeptiden en oligosacchariden die α -N-acetylgalactosaminyl residuen bevatten. De ziekte bezit 3 grote subtypes (Schindler & Desnick, 2015). Type 1 betreft de neurologische dystrofie die voorkomt bij kinderen en wordt geassocieerd met nagalasedeficiëntie. Dit is de meest ernstige vorm en waarbij in het derde en vierde levensjaar verschillende symptomen voorkomen, zoals achteruitgang van zicht en gehoor en psychomotorische retardatie. Dit kan zelfs leiden tot het overlijden van de patiënt (Sarbu, Munteanu, Dehelean, Petrescu, Peter-Katalinic, & Zamfir, 2015). Type 2, de ziekte van Kanzaki, is een milder type dat voorkomt bij adolescenten. Dit type veroorzaakt geen neurologische symptomen, maar wel angiokeratoma en gehoorproblemen (Ferreira & Gahl, 2017). Type 3 is een intermediaire vorm (Sakuraba, et al., 2003). Alle drie de subtypen leiden tot zeer lage levels van nagalaseactiviteit en tot grotendeels dezelfde accumulatie in de urine. Het zijn autosomale recessieve erfelijke aandoeningen (Schindler & Desnick, 2015).

4.2 Ziekte van Fabry

De ziekte van Fabry is net zoals de ziekte van Schindler & Kanzaki een stofwisselingsziekte die gekarakteriseerd wordt door onder andere rood-paarse plekjes op de huid (angiokeratoma corporis diffusum), gastro-enteritis en chronische luchtwegobstructie. Deze symptomen zijn het gevolg van de opstapeling van buitensporige hoeveelheden sfigolipiden.

De stof die bij patiënten met de ziekte van Fabry het meest accumuleert is globotriaosylceramide of Gb3. De oorzaak van deze ziekte ligt bij de verlaagde activiteit van galactosidase. Dit enzym katalyseert de hydrolytische splitsing van de terminale galactose van Gb3. De verlaagde activiteit is het resultaat van een mutatie in het GLA-gen, dat codeert voor het galactosidase. Er bestaat een verband tussen galactosidase en nagalase, want door een puntmutatie wordt de nagalaseactiviteit omgezet in een galactosidaseactiviteit en omgekeerd (Brady, 2010).

4.3 Influenza

Eerdere studies hebben aangetoond dat er verschillende oncogene en niet-oncogene virussen zijn die het immuunsysteem onderdrukken. In een gastheer die geïnfecteerd is met een virus worden zowel de humorale als de cellulaire immuniteit aangetast. Een infectie met een griepvirus is een vaak voorkomende oorzaak van morbiditeit en mortaliteit omwille van secundaire complicaties.

Influenza is een typische virale infectie gekenmerkt door een verminderde afweer vooral van oudere patiënten veroorzaakt door een vertraagde macrofaagactivatie. Macrofaagactivatie is net de eerste stap in de hele cascade van het lichaam om zich te beschermen tegen een infectie. Het influenzavirus maakt echter viraal gecodeerd nagalase dat in serum van patiënten terecht komt waar het de precursoractiviteit van Gc-globuline verlaagd. Het Gc-globuline dat volledig gedeglycosyleerd wordt op zijn O-glycaan functie kan geen vorming meer geven van Gc-MAF, wat nodig is voor een directe immuunrespons. Andere testen wijzen uit dat nagalase zich op een glycoproteïne van de virusenveloppe, het hemagglutinine (HA), bevindt en dat cellen die geïnfecteerd zijn met het influenzavirus viraal nagalase in de bloedbaan secreteren (Yamamoto & Urade, 2005).

4.4 Humaan immunodeficiëntievirus (hiv)

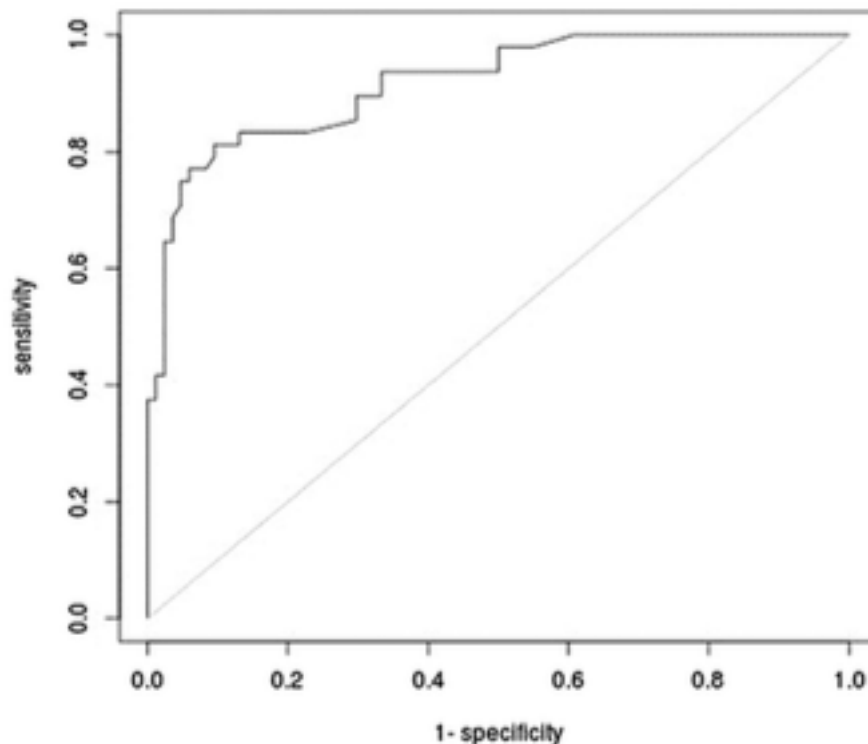
Net als bij influenza is de patiënt bij een hiv-infectie drager van een virus in het lichaam. Ook bij hiv-patiënten werd een verhoogde nagalaseactiviteit gedetecteerd in het bloed. Nagalase zorgt ook hier voor een deglycosylatie van Gc-globuline en bijhorende onderdrukking van het immuunsysteem. Bij de patiënten waarbij de infectie nog asymptomatisch was, werd een lagere nagalaseactiviteit gedetecteerd dan bij patiënten in een verder gevorderd stadium. Hoe verder de patiënt dus vordert, hoe sterker het immuunsysteem wordt onderdrukt en hoe zwakker de patiënt wordt (Yamamoto, Naraparaju, & Srinivasula, 1995). Ergens schuilt er dus de mogelijkheid om patiënten met een virale infectie, zoals influenza en hiv, te behandelen met Gc-MAF, om zo hun immuunrespons te versterken (Hegde, Rao, Bayry, & Kaveri, 2009). Hiervoor is echter nog veel onderzoek vereist om deze hypothese te bevestigen.

4.5 Autisme

Autisme is een ontwikkelingsstoornis die voorkomt bij 1 op de 88 kinderen. Deze aandoening ontstaat door verschillende complexe ontregelingen van het immuunsysteem, inclusief auto-immuniteit. Bij kinderen met een autismespectrumstoornis werd een verhoogde nagalaseactiviteit vastgesteld, maar dit verband is voorlopig nog onduidelijk. Aangezien een verhoogde nagalaseactiviteit wijst op een ontregeld immuunsysteem bestaat de hypothese dat het toedienen van Gc-MAF aan autistische kinderen een mogelijke therapie kan zijn (Bradstreet, Vogelaar, & Thyer, 2012). Ook hiervoor is nog verder onderzoek nodig.

4.6 Alcohol

Alcoholverslaving is wereldwijd een vaak voorkomend sociaal en medisch probleem. Aan deze verslaving zijn soms ook verstrekkende gevolgen en complicaties verbonden. Overmatig alcoholgebruik kan leiden tot aantasting van de cognitieve functies en in extreme gevallen tot hersenschade. Volgens de studie van Zoga et al. (2016) werden bij patiënten met een alcoholverslaving nagalase-serumactiviteiten gevonden die drie keer verhoogd waren t.o.v. de controlegroep. De hoogste nagalaseconcentratie binnen deze controlegroep bedroeg 31,28 ng/ml. De *receiver operating characteristic* (ROC) curve in Figuur 4 toont dat de nagalaseactiviteit tussen alcoholpatiënten en de controlegroep verschillend is. De constructie van een ROC-curve wordt uitgelegd in 5.2.1 ROC-curve.



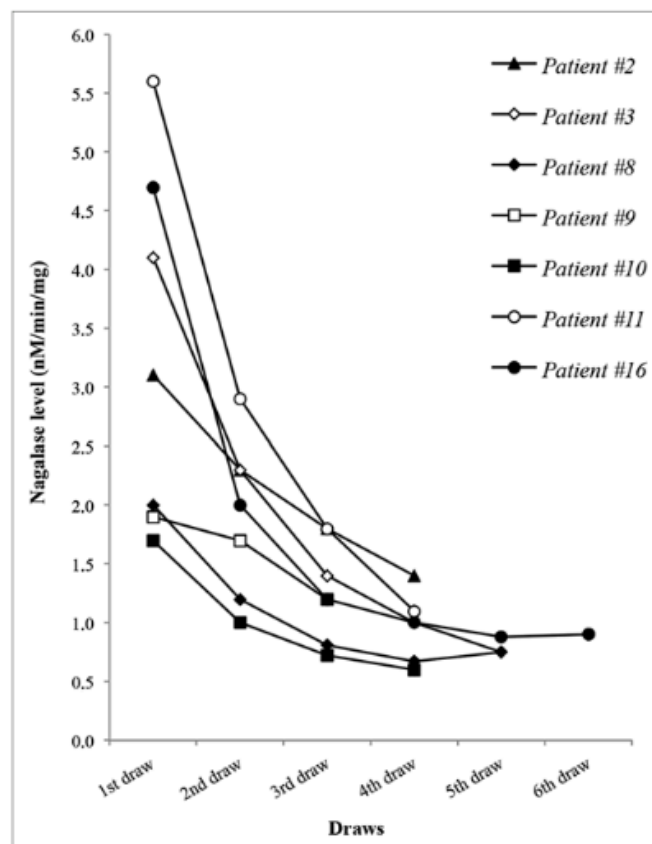
Figuur 4: ROC-curve voor nagalase bij patiënten met een alcoholverslaving (Zoga, et al., 2016)

Over de rol van nagalase bij alcoholverslaving is weinig geweten. Alcoholmisbruik zou echter een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, maar dat effect op nagalase-expressie is omkeerbaar. Er is vastgesteld dat in het serum van alcoholisten, die gedurende een periode van 5 weken geen alcohol mochten gebruiken, de nagalaseactiviteit gedurende deze periode lineair daalt (Zoga, et al., 2016).

4.7 Kanker

Er zijn in het verleden verscheidene studies verschenen die nagalase linken aan verschillende soorten kanker, onder andere prostaat-, eierstok-, blaas- en darmkanker (Yamamoto, Suyama, Nakazato, Yamamoto, & Koga, 2008). Er werd verondersteld dat bij deze kankerpatiënten de nagalaseactiviteit in het bloed rechtstreeks in verband staat met de grootte van de tumor en het stadium van de kanker.

Uit het onderzoek van Thyer et al. (2013) is gebleken dat de behandeling van deze kankerpatiënten met Gc-MAF leidt tot het terugdringen van de nagalaseproductie door de tumoren, zie ook Figuur 5.



Figuur 5: Daling van de nagalaseactiviteit na behandeling met Gc-MAF (Thyer , et al., 2013)

Of behandeling met Gc-MAF tumorgroei doet stoppen of bestrijden is nog niet voldoende onderzocht, waardoor geen eenduidige conclusie te trekken is (Thyer , et al., 2013).

5 Materiaal en methode

5.1 Materiaal

5.1.1 Victor X4 Multilabel Plate Reader

De Victor X4 Multilabel Plate Reader van Perkin Elmer (zie Figuur 6) detecteert onder andere via fluorescentie en absorptie (Perkin Elmer, 2010). Het berekent concentraties aan de hand van een ijklijn, brengt verdunningen in rekening en berekent variatiecoëfficiënten (cv) met behulp van het softwarepakket Work Out. Er is ook een temperatuurfunctie aanwezig en stalen kunnen voor elke meting automatisch geschud worden.



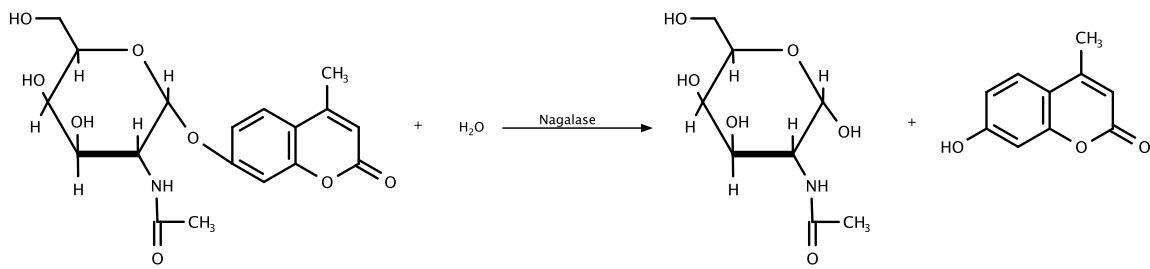
Figuur 6: Victor X4 Multilabel Plate Reader van Perkin Elmer (Midsci, 2015)

5.1.2 Capture antilichaam

Bij de ELFIA wordt er gebruik gemaakt van een *capture* antilichaam (AL) dat nagalase in het serum vangt. Bij de *capture* techniek wordt het AL, specifiek voor nagalase, op de PVC 96-well plaat gebonden. Dit gebeurt via passieve adsorptie in aanwezigheid van een carbonaat/bicarbonaatbuffer met een pH van 9,6 (Thermo Fischer Scientific, 2017). Het AL dat hier gebruikt wordt is het polykloonaal anti-NAGA antilichaam, geproduceerd in konijnen.

5.1.3 Substraat

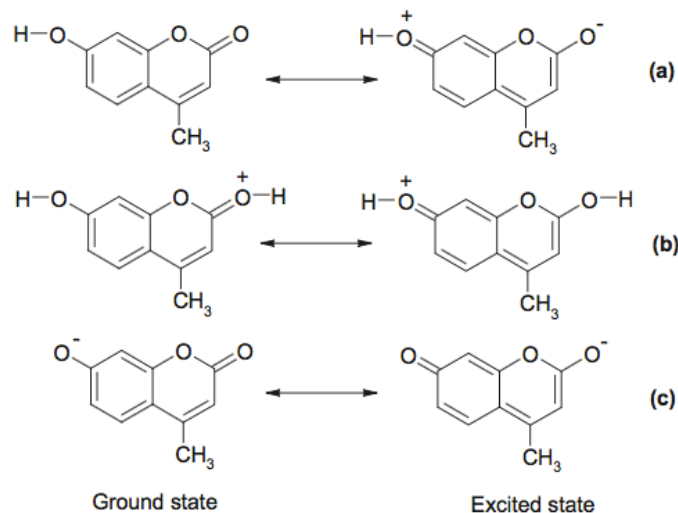
Het fluorescent substraat dat wordt gebruikt in deze ELFIA- en FA-test is het 4-methylumbelliferyl- α -N-acetyl-D-galactosaminide van de firma Moscherdam. De structuur hiervan is weergegeven in Figuur 7. Nagalase dat aanwezig is in het serum hydrolyseert de binding tussen N-acetyl-galactose en 4-methylumbelliferyl, waardoor 4-methylumbelliferyl vrijkomt.



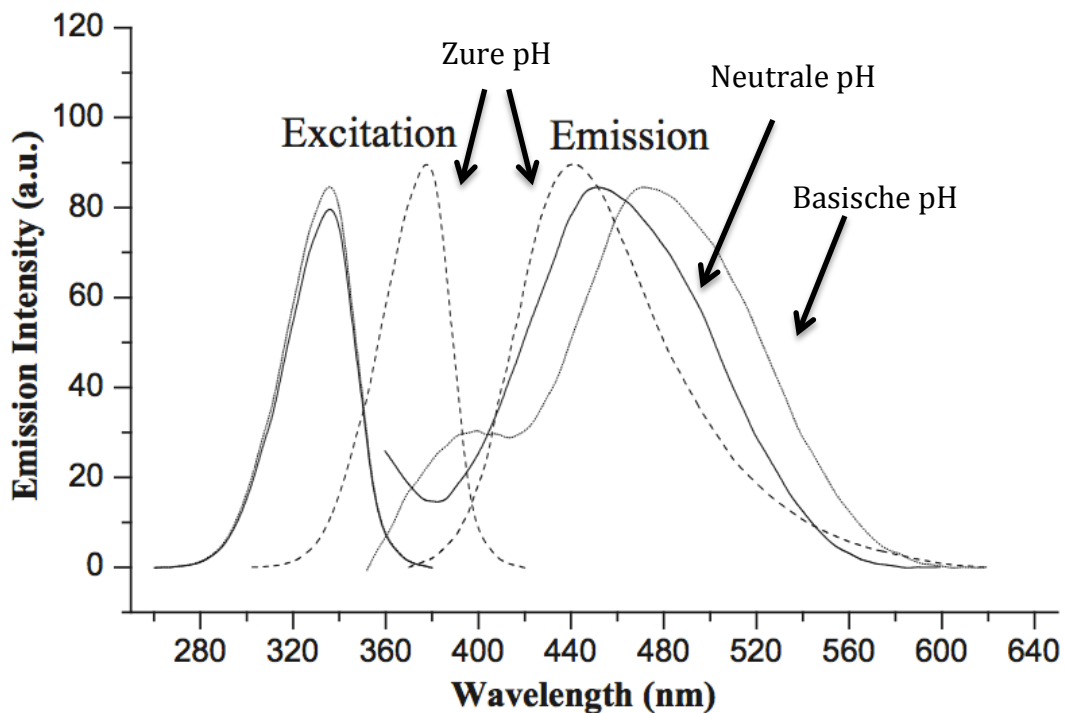
Figuur 7: Reactie van nagalase en 4-methylumbelliferyl- α -N-acetyl-D-galactosaminide

Indien dit bestraald wordt met licht van de juiste golflengte worden er elektronen van het 4-methylumbelliferyl geëxciteerd. Bij terugvallen naar de grondtoestand zendt 4-methylumbelliferyl licht uit, met een specifieke en hogere golflengte dan het licht waarmee wordt bestraald. Het toestel detecteert deze laatste golflengte. Afhankelijk van de zuurtegraad van het milieu waarin gewerkt wordt, dienen de golflengten van excitatie en fluorescentie aangepast te worden, zie Figuur 8 en Figuur 9.

In de FA-test die hier is ontwikkeld, wordt gewerkt in een licht zure pH door het gebruik van een licht zure substraatbuffer (zie Bijlage B: Protocol FA nagalase). Na een bepaalde incubatietijd wordt de enzymatische reactie gestopt met een basische bicarbonaatbuffer, waardoor de pH sterk stijgt (zie Bijlage B: Protocol FA nagalase). Het spectrum voor 4-methylumbelliferyl in zuur milieu is in Figuur 9 weergegeven als stippelijntje. De excitatiepiek ligt bij 375 nm, terwijl de fluorescentie- of emissiepiek bij 440 nm ligt. Bij deze golflengten wordt dan ook gedetecteerd.



Figuur 8: Structuur van 4-methylumbelliferyl in neutraal (a), zuur (b) en basisch (c) midden (Al-Kady , Ahmed , Gaber , Hussein , & Ebeid , 2011)



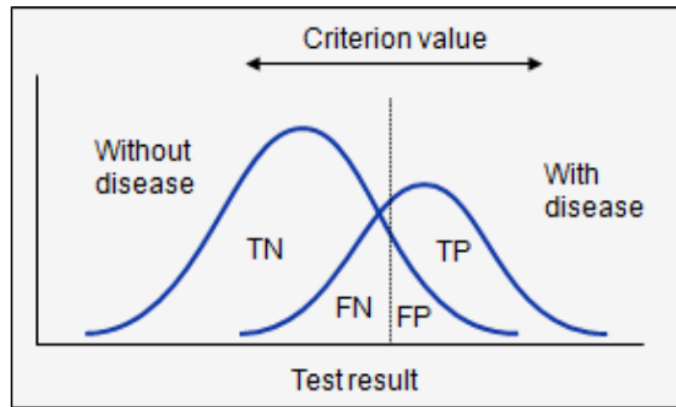
Figuur 9: Excitatie en fluorescentie spectra van 4-methylumbelliferyl bij verschillende pH's (Al-Kady , Ahmed , Gaber , Hussein , & Ebeid , 2011)

5.2 Methode

5.2.1 ROC-curve

Een *receiver operating characteristics* (ROC) curve is een techniek die kan helpen in het maken van medische beslissingen. In deze masterproef wordt de curve gebruikt om na te gaan in welke mate deze test gezonde en zieke personen van elkaar onderscheidt. Voor een ROC-curve zijn 2 gegevensreeksen vereist: een reeks resultaten van de personen die werden getest en een classificatiegetal. Dit classificatiegetal verdeelt de testpersonen in 2 groepen. Bij de laboanalyses wordt voor de zieke personen het classificatiegetal 1 gekozen, voor de gezonde mensen wordt het getal 0 gekozen.

Na het invoeren van de meetresultaten stelt het softwarepakket MedCalc hiervan een model op. Het model wordt voorgesteld in één grafiek met een overlay van 2 curven, 1 curve voor de zieke personen en 1 voor gezonde mensen. Op de X-as wordt de waarde van de onderzochte parameter, hier de nagalaseactiviteit, uitgezet. De Y-as van de curve geeft weer hoe vaak een meting voorkomt (Fawcett, 2006). Dit wordt weergegeven op Figuur 10.

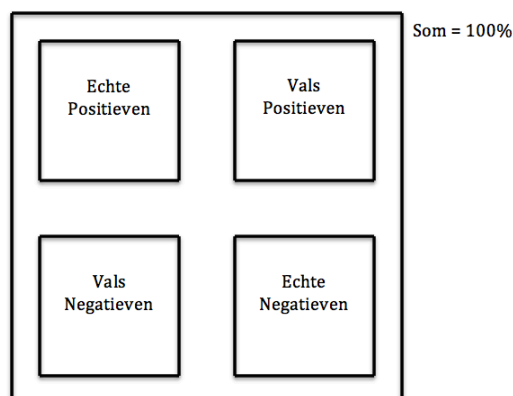


Figuur 10: Gecombineerde gausscurves van 2 onderzochte categorieën met in Y-as het signaal en in X-as de onderzochte parameter (Zweig & Campbell, 1993)

Op de figuur zijn 4 oppervlakken waar te nemen:

- TN (true negative): echte negatieven (een parameter voor de specificiteit van de test);
- FN (false negative): vals negatieven;
- FP (false positive): vals positieven;
- TP (true positive): echte positieven (een parameter voor de gevoeligheid van de test).

De som van de 4 oppervlakken samen is 100%. Aan de hand van Figuur 11 is te zien dat het aantal vals positieven gelijk is aan één min het aantal echte negatieven (= specificiteit).

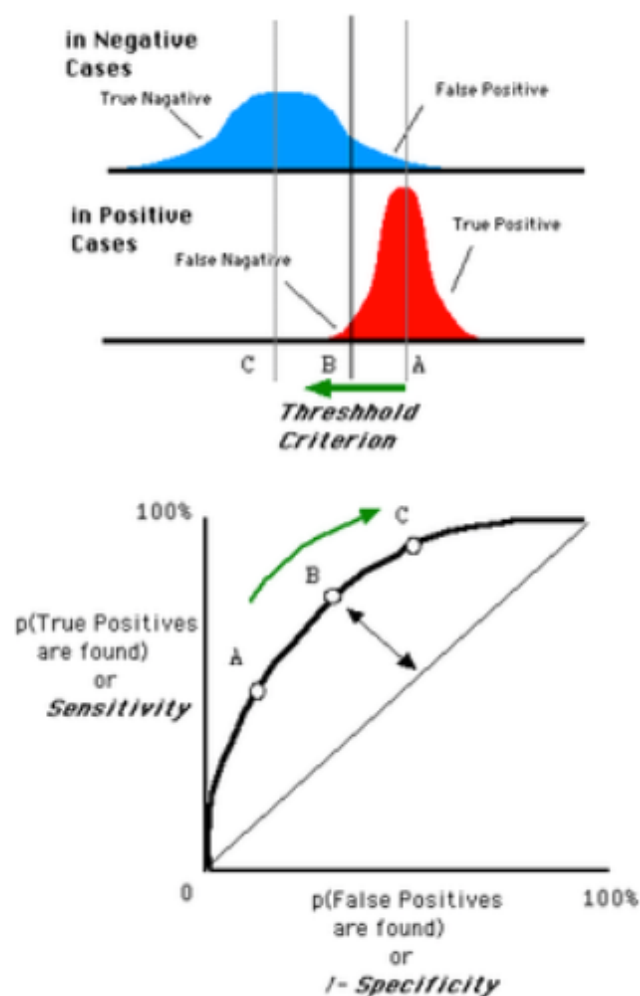


Figuur 11: Verhouding 4 oppervlakken gecombineerde gausscurves

In het ideale geval overlappen beide curves elkaar niet, er zijn dan maar 2 zones waarneembaar: 100% specificiteit en 100% gevoeligheid. De software zoekt ook voor alle gevallen de *cut-off* waarde.

Dit is de beste waarde waarbij de test als positief kan beschouwd worden met een zo groot mogelijke gevoeligheid (zoveel mogelijk zieke personen die ook als ziek geïdentificeerd worden = aantal echte positieven) en een zo laag mogelijk aantal vals positieven (zo weinig mogelijk gezonde personen die als ziek geïdentificeerd worden = aantal vals positieven). Het programma zal de optimale *cut-off* waarde als eindresultaat meegeven.

Vervolgens kan de ROC-curve getekend worden door de *cut-off* waarde te laten variëren. Hiervoor wordt op de Y-as de gevoeligheid (= aantal echte positieven) uitgezet bij een gekozen *cut-off* waarde en op de X-as het aantal vals positieven. De waarden van beide assen worden telkens in procent weergegeven (het percentage is berekend ten opzichte van het aantal geteste personen). Op Figuur 12 is te zien hoe de ROC-curve wordt opgebouwd. Des te steiler de curve, des te minder vals positieven worden waargenomen bij een bepaalde *cut-off* waarde. Elk punt op de ROC-curve staat dus voor een echt positief/vals positief verhouding bij een gekozen *cut-off* waarde (Zweig & Campbell, 1993).



Figuur 12: Opbouw ROC-curve (Neko, 2005)

Het is de oppervlakte onder de curve (AUC) die gebruikt wordt om verschillende testen en methodes te vergelijken. De AUC geeft aan in hoeverre een parameter, in dit geval nagalaseactiviteit, mag gebruikt worden om een onderscheid te maken tussen 2 groepen. Hiermee kan dus nagegaan worden of er een verschil is tussen de nagalaseactiviteit van gezonde mensen t.o.v. de nagalaseactiviteit van personen die lijden aan een bepaalde aandoening. Hoe groter de AUC, hoe beter de nagalaseactiviteit als criterium geschikt is om een onderscheid te maken tussen de groepen. Om echter te bewijzen dat er een significant verschil is tussen de 2 groepen dient de P-waarde lager dan 0,05 te zijn (Fawcett, 2006).

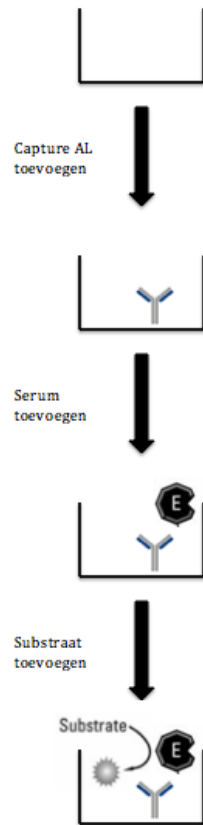
5.2.2 Methodes voor de bepaling van nagalaseactiviteit

Om de nagalaseactiviteit te bepalen in humanserum zijn verschillende methodes geschikt, namelijk een ELFIA en een FA. Er werd gestart met de ELFIA omdat bij deze methode theoretisch gezien eventueel storende componenten in het serum zouden worden weggewassen, omdat met een goed *capture* AL enkel nagalase bindt aan de plaat. Toch gaf de ELFIA geen bevredigende en reproduceerbare resultaten, daarom wordt ook een rechtstreekse methode (FA) getest. Tenslotte kon ook de commercieel verkrijgbare ELISA in een sandwichformaat op basis van specifieke polyclonale AL tegen het nagalase worden uitgetest. Een nadeel van deze test is dat deze neerkomt op een concentratiebepaling van nagalase uitgedrukt in ng/ml, daar waar historisch gezien in de literatuur alle studie werden uitgevoerd met activiteitsbepalingen met als eenheid de hoeveelheid nmol substraat (N-acetylgalactosamine) die afsplitst per minuut en per milliliter. Hoewel deze methode bruikbaar bleek om de nagalaseconcentratie in de serumpool (samenvoegen van meer dan 100 individuele sera) te bepalen. Deze serumpool werd trouwens verder gebruikt om de FA te standaardiseren.

5.2.2.1 Enzyme-linked fluoroimmunoassay (ELFIA)

Het volledige protocol van de ELFIA is bijgevoegd als Bijlage A: Protocol ELFIA nagalase. Hieronder staat een beknopte beschrijving van de handelingen die moeten gebeuren (zie Figuur 13):

- pipetteer in elke well 150 μ l capture AL en incubeer;
- was de plaat, pipetteer in elke well 100 μ l staal/standaard/controle (20 μ l staal/standaard/controle + 80 μ l serum diluent) en incubeer;
- was de plaat, pipetteer in elke well 100 μ l verdunde substraatoplossing en incubeer;
- meet om de 3 minuten de emissie bij 460 nm.

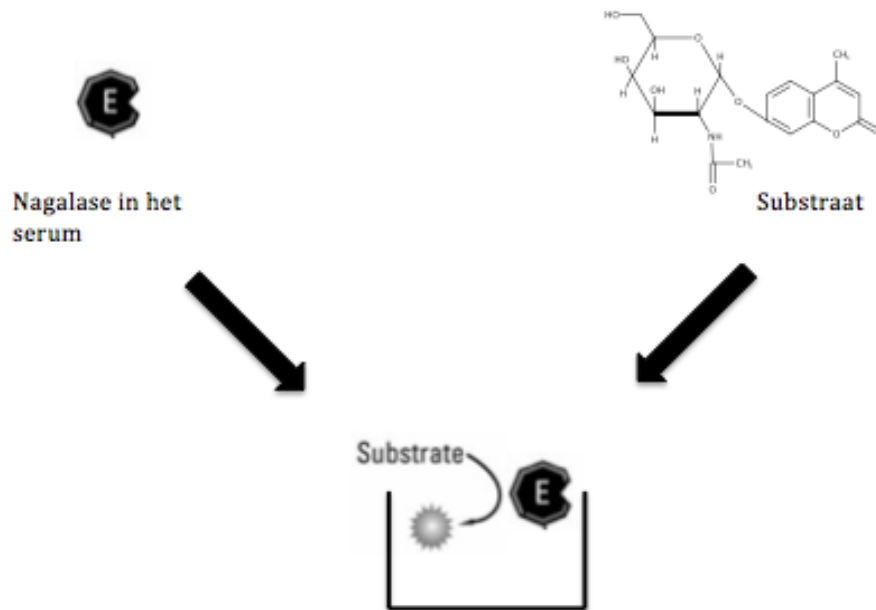


Figuur 13: Overzicht ELFIA

5.2.2.2 Fluorescent assay (FA)

Het volledige protocol voor de rechtstreekse FA-test is toegevoegd als Bijlage B: Protocol FA nagalase. Om de nagalaseactiviteit in stalen te meten is het noodzakelijk om deze stalen 2 maal te verdunnen in PBS. Hieronder staat een korte opsomming van de handelingen die er moeten gebeuren (zie Figuur 14):

- pipetteer in elke well 50 μ l staal-/standaardoplossing;
- pipetteer in elke well 50 μ l substraatoplossing;
- incubeer de plaat 2u bij 37°C;
- pipetteer in elke well 200 μ l bicarbonaatbuffer om de reactie te stoppen;
- laat voor de meting de plaat schudden;
- meet de emissie bij 460 nm.



Figuur 14: Overzicht FA

5.2.3 Concentratiebepaling nagalase in humaan serum

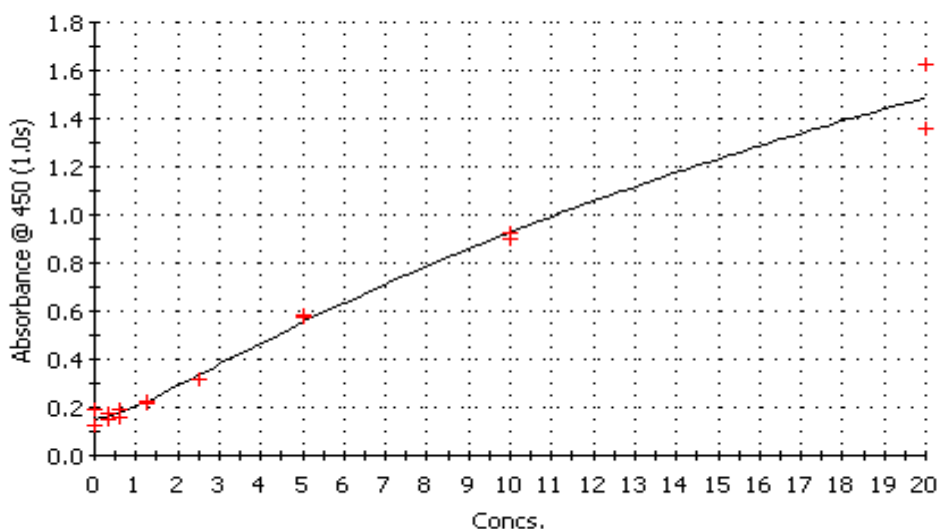
De concentratie in het serum wordt bepaald met behulp van de *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for NAGA* van USCN Life Science inc. Via deze kit wordt er met een nagalase-standaard een ijklijn opgesteld. De nagalaseconcentraties van de standaardverdunningen worden dan uitgezet in de X-as van de nagalase-ijklijn. In de Y-as worden de overeenkomstige absorbantie (Thewissen, Mijatovic, De Meirleir, & Bosmans)waarden bij 450 nm uitgezet. Via de absorbantiewaarde van het serum kan de nagalaseconcentratie in humaan serum worden bepaald. Het volledige protocol van de kit is opgenomen in Bijlage C: Protocol concentratiebepaling nagalase. Hieronder staat alvast een beknopte instructie:

- pipetteer in elke well 100 μ l staal-/standaardoplossing en incubeer;
- was de plaat, pipetteer in elke well 100 μ l *Detection Reagent A* en incubeer;
- was de plaat, pipetteer in elke well 100 μ l *Detection Reagent B* en incubeer;
- was de plaat, pipetteer in elke well 90 μ l substraatoplossing en incubeer;
- pipetteer in elke well 50 μ l stopoplossing;
- meet elke de absorbantie bij 450 nm.

6 Resultaten

6.1 Concentratiebepaling nagalase in humanserum

In de kit van USCN Life Science inc zit een nagalase-standaard waarmee via geschikte verdunningen een ijkcurve wordt opgesteld, zie Figuur 15. Om een ijkcurve op te stellen wordt er een verdunningsreeks van de nagalase-standaard ingezet met nagalaseconcentraties van 0; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 en 20 ng/ml. Met deze verdunningsreeks kan de nagalaseconcentratie in onze humane serumpool bepaald worden via software, aangepast aan ELISA-metingen op het Victor 4X toestel.



Figuur 15: Ijkcurve van nagalaseconcentratie in serum

Het softwarepakket Work Out heeft berekend, aan de hand van een 5-parametervergelijking, dat de nagalaseconcentratie in de humane serumpool 14,6 ng/ml is, fotometrisch bepaald met de USCN ELISA-kit aangekocht bij Antibodies Online (Duitsland). Omdat in klinische studies in de literatuur telkens nagalaseactiviteiten vermeld worden in plaats van concentraties wordt in dit onderzoek verder gegaan met nagalaseactiviteiten. Uit voorgaand werk is gebleken dat in de serumpool een nagalaseactiviteit van 0,70 nmol/min.ml aanwezig is en het is deze standaard die verder gebruikt wordt in de FA-test (Thewissen, Mijatovic, De Meirleir, & Bosmans). De totale nagalaseconcentratie in deze pool is dus 14,6 ng/ml, maar vermits er niet geweten is hoe groot de fractie aan enzymatisch actief nagalase is in deze pool, is het vooralsnog niet mogelijk de bekomen concentratie te converteren in specifieke nagalaseactiviteit.

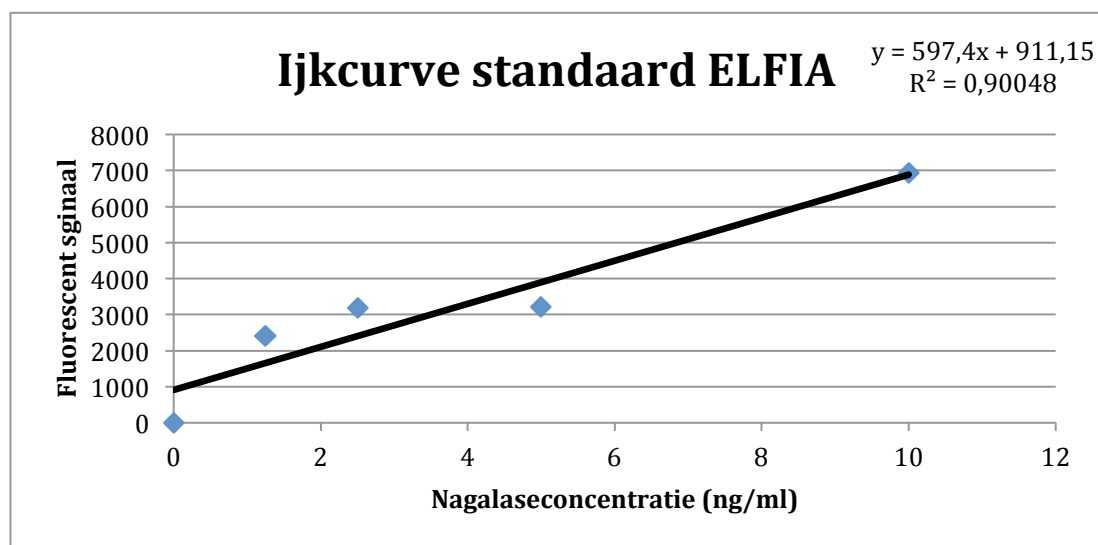
6.2 ELFIA

Er werden verschillende verhoudingen substraat en staal, verschillende incubatietijden en verschillende substraatconcentraties getest. De concentraties en volumes uit Tabel 3 gaven de beste resultaten.

Tabel 3: Inhoud 96-well plaat ELFIA

Volume standaard/staal op plaat	20 μ L standaard/staal + 80 μ L serum diluent
Incubatieduur standaard/staal op plaat	2 uur
Substraatconcentratie	0,15 mM
Volume substraat op plaat	100 μ L
Incubatieduur substraat op plaat	1 uur

Voor de ELFIA wordt niet gewerkt met serumverduunningen als ijklijn, maar wel met de nagalase-standaard uit de *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for NAGA* van USCN Life Science inc. Deze standaard kan enkel bij de ELFIA gebruikt worden omdat bij deze methode een *capture AL* wordt gebruikt, wat niet het geval is bij de FA. De signalen die bij standaardverduunningen zijn gemeten, zijn opgenomen in Figuur 16.



Figuur 16: Ijkllijn standaard ELFIA

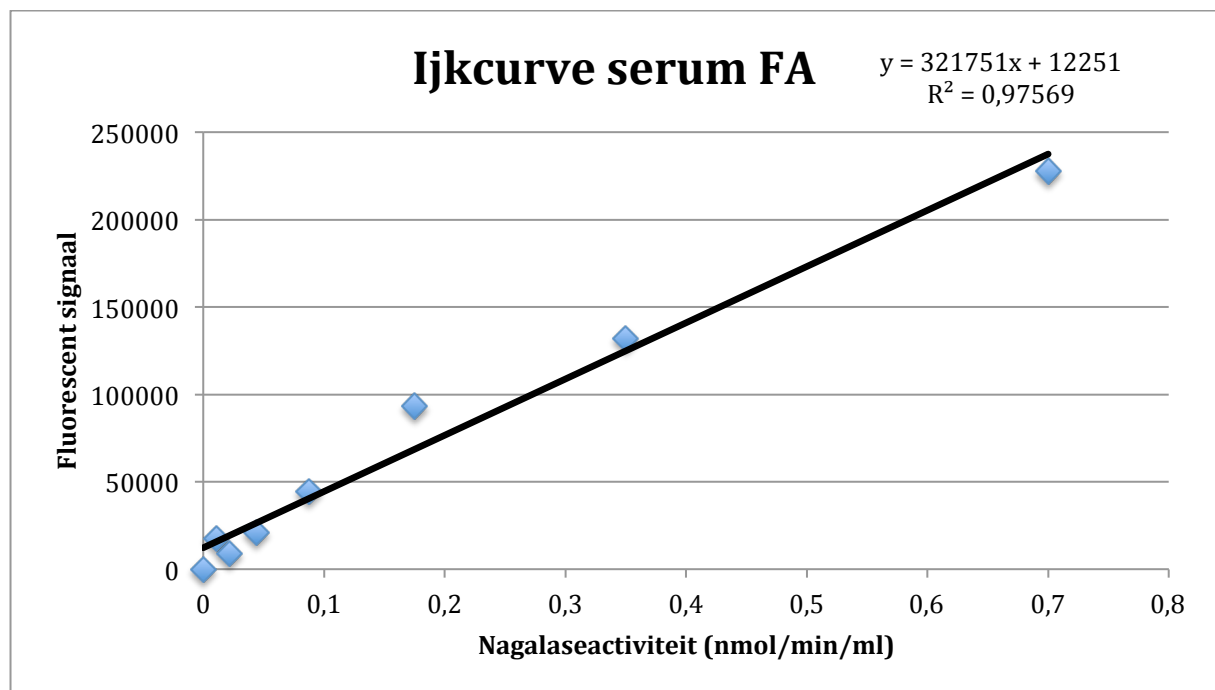
Figuur 16 toont een ijklijn die geconstrueerd is met de ELFIA. Deze ijklijn werd telkens ingezet samen met de verschillende stalen. Slechts eenmalig zag deze ijklijn eruit zoals op bovenstaande figuur. Wegens de slechte reproduceerbaarheid, ook na het veranderen van tal van parameters is beslist om over te schakelen op de FA-test omdat deze resultaten bij de start veelbelovender waren.

6.3 Fluorescent assay (FA)

Aangezien de nagalaseactiviteit in de serumpool gekend is, namelijk 0,70 nmol/min.ml, wordt een ijklijn opgesteld op basis van gekozen serumverdundingen (1, 2, 4, 6, 8, 16, 32 en 64 keer). Bijhorende activiteiten zijn weergegeven in Tabel 4. Ook wordt steeds een blanco oplossing (PBS) ingezet. De gemeten signalen bij 460 nm vormen de Y-as van de ijkcurve (zie Figuur 17).

Tabel 4: Verdunningsreeks serum

Serumverdunding	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Fluorescent signaal (blanco afgetrokken)
Onverdund	0,70	227749
2 keer verdund	0,35	132241
4 keer verdund	0,18	93223
8 keer verdund	0,09	44436
16 keer verdund	0,04	21021
32 keer verdund	0,02	8885
64 keer verdund	0,01	17383
Blanco (= PBS)	0	0



Figuur 17: Ijklijn serum FA

Deze ijklijn wordt gebruikt om de nagalaseactiviteit in patiëntstalen te bepalen. Er zijn verschillende verhoudingen van staal en substraat getest en uiteindelijk is de verhouding uit Tabel 5 de beste gebleken. De volumes uit Tabel 5 worden dus toegepast bij alle staalanalyses.

Tabel 5: Inhoud 96-well plaat FA

Volume staal op plaat (staal 2x verdund in PBS)	50 μ L
Incubatieduur	2 uur
Substraatconcentratie	0,1 mM
Volume substraat op plaat	50 μ L
Volume bicarbonaatbuffer	200 μ L

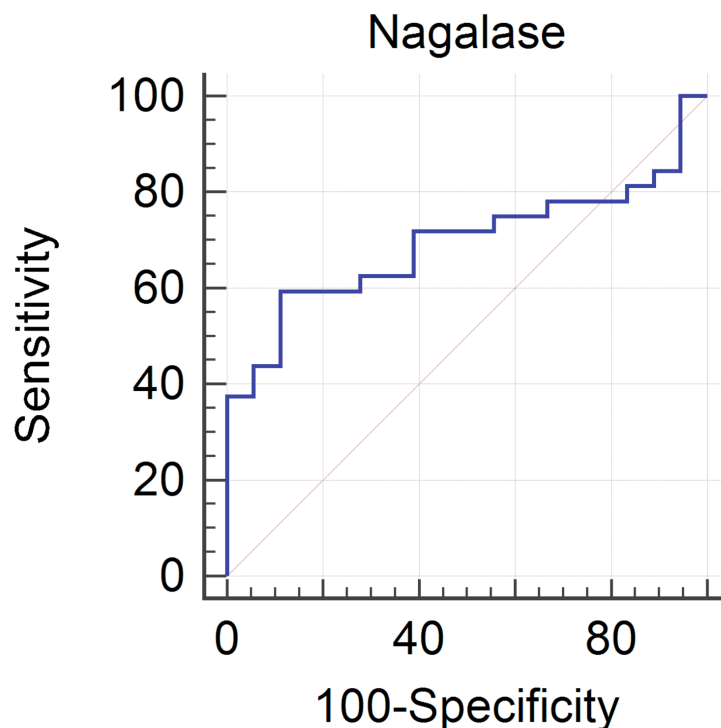
6.3.1 Alcohol

Om het verband tussen nagalaseactiviteit en alcoholisme na te gaan worden 33 stalen getest van mensen met een verhoogde alcoholconsumptie. Deze worden vergeleken met 18 stalen van personen met een normaal drinkpatroon. Met de signalen die gemeten worden en te zien zijn in Tabel 6 kan een ROC-curve opgesteld worden om vast te stellen of er een significant verschil is tussen de alcoholmisbruikers en de mensen met een normaal drinkpatroon (zie Figuur 18).

Tabel 6: Overzicht resultaten FA alcoholmisbruik

Staal nr.	Normaal/verhoogd alcoholgebruik	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	Normaal/verhoogd alcoholgebruik	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
1	Normaal	0,55	27	Verhoogd	0,42
2	Normaal	0,72	28	Verhoogd	0,77
3	Normaal	0,67	29	Verhoogd	0,91
4	Normaal	0,52	30	Verhoogd	0,96
5	Normaal	0,63	31	Verhoogd	0,77
6	Normaal	0,70	32	Verhoogd	0,97
7	Normaal	0,55	33	Verhoogd	1,03
8	Normaal	0,73	34	Verhoogd	0,49
9	Normaal	0,70	35	Verhoogd	0,76
10	Normaal	0,61	36	Verhoogd	0,47
11	Normaal	0,39	37	Verhoogd	2,84
12	Normaal	0,71	38	Verhoogd	0,51
13	Normaal	0,68	39	Verhoogd	0,63
14	Normaal	0,85	40	Verhoogd	1,09
15	Normaal	0,61	41	Verhoogd	0,69
16	Normaal	0,56	42	Verhoogd	0,47
17	Normaal	0,51	43	Verhoogd	1,33

Staal nr.	Normaal/verhoogd alcoholgebruik	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	Normaal/verhoogd alcoholgebruik	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
18	Normaal	0,92	44	Verhoogd	1,33
19	Verhoogd	6,99	45	Verhoogd	8,17
20	Verhoogd	1,11	46	Verhoogd	0,82
21	Verhoogd	0,59	47	Verhoogd	0,49
22	Verhoogd	0,87	48	Verhoogd	1,1
23	Verhoogd	0,54	49	Verhoogd	0,82
24	Verhoogd	0,96	50	Verhoogd	1,07
25	Verhoogd	0,99	51	Verhoogd	0,69
26	Verhoogd	0,71			



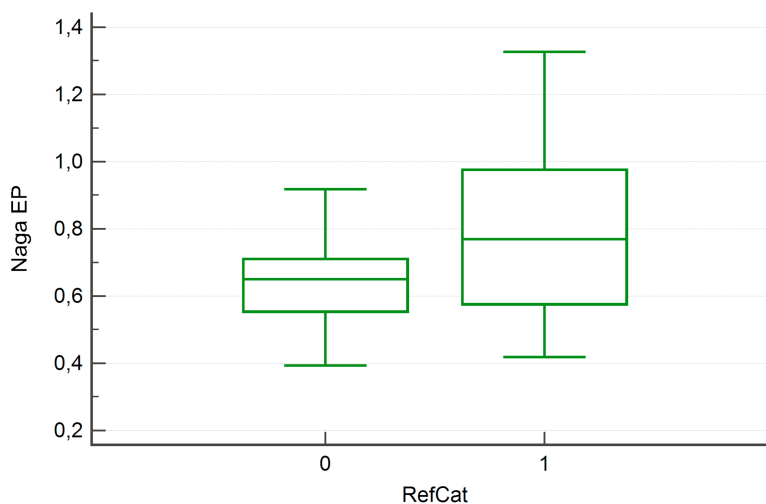
Figuur 18: ROC-curve onderscheid tussen alcoholmisbruik en controlegroep

Door de software wordt berekend dat de AUC-waarde van deze test 0,694 bedraagt (zie Tabel 7). Deze AUC-waarde in combinatie met een zeer lage P-waarde toont aan dat er wel degelijk een significant verschil is tussen de patiënten die alcohol misbruiken en deze die normaal drinken. De nagalaseactiviteit kan dus gebruikt worden om het alcoholdrinkpatroon van een patiënt op te volgen. In de boxplot (Figuur 19) en Tabel 7 volgt dat de mediaan van de controlegroep 0,651 nmol/min.ml bedraagt, deze van de alcoholisten is 0,794 nmol/min.ml.

Tabel 7: Gegevens ROC-curve nagalase en alcoholmisbruik

Variabele	Nagalaseactiviteit
Aantal stalen	50
Aantal stalen alcoholmisbruik	32
Aantal stalen controlegroep	18
AUC	0,694
P-waarde (significantie)	0,0090
Mediaan controlegroep	0,651 nmol/min.ml
Mediaan alcoholmisbruik	0,794 nmol/min.ml

Er kan niet alleen geconcludeerd worden dat er een significant verschil is met de patiënten die een alcohol probleem hebben, maar Figuur 19 toont ook aan dat de nagalaseactiviteit bij deze patiënten hoger ligt dan bij normale drinkers. Op deze figuur staan de 2 categorieën van patiënten en bijhorende signalen. Het is duidelijk dat de mediaan van de nagalaseactiviteit bij de mensen met een verhoogd alcoholgebruik hoger ligt dan de mediaan van de normale drinkers. Er wordt ook vastgesteld dat de hoogste nagalaseactiviteiten van de alcoholisten ongeveer dubbel zo hoog zijn als de mediaan van de controlegroep. Deze vaststelling sluit aan bij de studie van Zoga et. al (2016) waarnaar verwezen wordt op pagina 29.



Figuur 19: Boxplot nagalase en alcoholmisbruik (0 = normale drinkers, 1 = alcoholmisbruik)

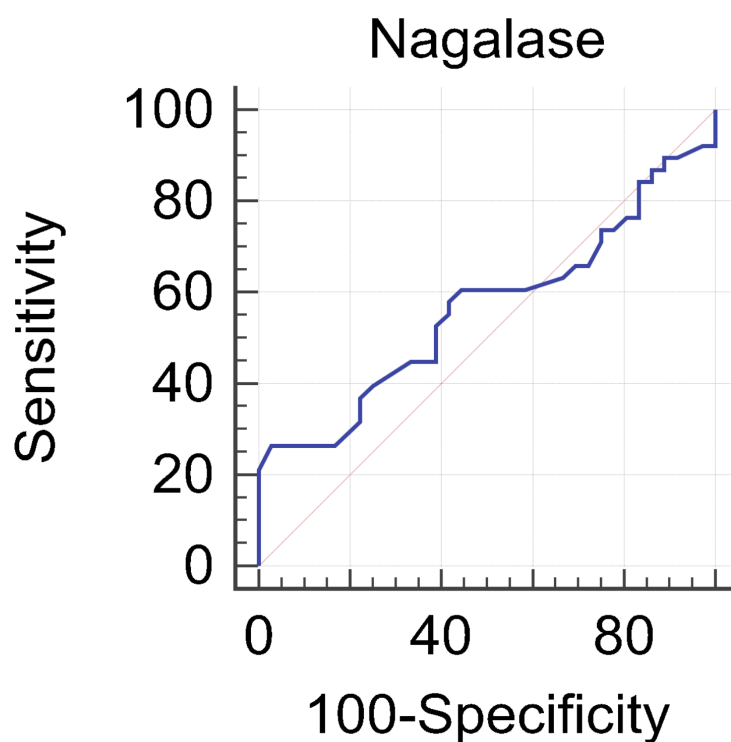
6.3.2 Prostaatkanker

Om te bepalen of nagalase een geschikte parameter is om prostaatkanker op te volgen worden 38 stalen getest van mensen met prostaatkanker (verhoogde PSA-waarde) en 36 stalen van mensen die een prostatectomie ondergaan hebben. Met de FA-test worden volgende signalen bekomen, zie Tabel 8. Aan de hand van deze signalen wordt een ROC-curve opgesteld om te zien of er een verschil merkbaar is (zie Figuur 20).

Tabel 8: Overzicht resultaten FA prostaatkanker

Staal nr.	PSA-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	PSA-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
1	Normaal	0,67	37	Verhoogd	0,90
2	Normaal	0,91	38	Verhoogd	1,03
3	Normaal	0,87	39	Verhoogd	1,65
4	Normaal	0,87	40	Verhoogd	0,64
5	Normaal	0,67	41	Verhoogd	1,1
6	Normaal	0,9	42	Verhoogd	1,84
7	Normaal	0,83	43	Verhoogd	0,97
8	Normaal	1,02	44	Verhoogd	0,74
9	Normaal	1,12	45	Verhoogd	0,76
10	Normaal	1,08	46	Verhoogd	0,83
11	Normaal	0,80	47	Verhoogd	0,56
12	Normaal	0,72	48	Verhoogd	1,00
13	Normaal	0,90	49	Verhoogd	0,75
14	Normaal	0,88	50	Verhoogd	0,93
15	Normaal	0,76	51	Verhoogd	0,73
16	Normaal	0,93	52	Verhoogd	0,94
17	Normaal	0,97	53	Verhoogd	0,99
18	Normaal	1,20	54	Verhoogd	0,91
19	Normaal	0,75	55	Verhoogd	1,15
20	Normaal	0,95	56	Verhoogd	0,74
21	Normaal	0,76	57	Verhoogd	0,81
22	Normaal	0,86	58	Verhoogd	0,85
23	Normaal	0,89	59	Verhoogd	0,72
24	Normaal	0,70	60	Verhoogd	0,99
25	Normaal	1,15	61	Verhoogd	0,93
26	Normaal	1,15	62	Verhoogd	0,54
27	Normaal	0,88	63	Verhoogd	1,28
28	Normaal	0,69	64	Verhoogd	0,82
29	Normaal	0,92	65	Verhoogd	0,76
30	Normaal	0,90	66	Verhoogd	0,81

Staal nr.	PSA-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	PSA-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
31	Normaal	0,76	67	Verhoogd	0,66
32	Normaal	0,66	68	Verhoogd	0,48
33	Normaal	0,71	69	Verhoogd	0,57
34	Normaal	0,73	70	Verhoogd	0,56
35	Normaal	0,98	71	Verhoogd	0,62
36	Normaal	0,77	72	Verhoogd	0,66
			73	Verhoogd	0,64
			74	Verhoogd	0,86



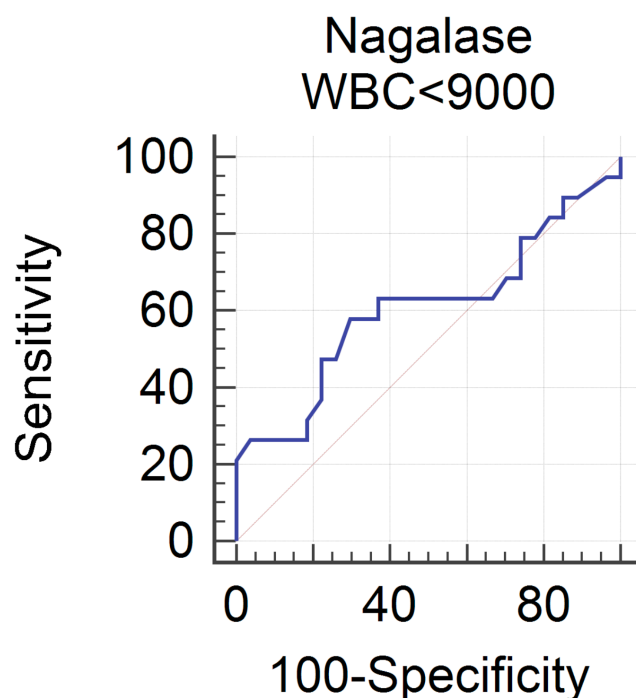
Figuur 20: ROC-curve onderscheid prostaatkanker en controlegroep

Door de software wordt berekend dat de AUC-waarde van deze test 0,563 bedraagt (zie Tabel 9). Deze AUC-waarde in combinatie met een hoge P-waarde toont aan dat er geen significant verschil is met de patiënten van wie de prostaat is weggenomen (zie Tabel 9). In tegenstelling tot wat in de literatuur beschreven staat, blijkt nagalase geen ideale parameter wat betreft opvolging van prostaatkanker.

Tabel 9: Gegevens ROC-curve nagalase en prostaatkanker

Variabele	Nagalaseactiviteit
Aantal stalen	74
Aantal stalen prostaatkanker	38
Aantal stalen prostatectomie	36
AUC	0,563
P-waarde (significantie)	0,3576

Een mogelijke verklaring hiervoor is het storende effect van polynucleaire leukocyten. De gemiddelde levensduur van deze witte bloedcellen bedraagt 3 dagen. Na 3 dagen zijn de cellen gelyseerd en komt de celinhoud vrij. Aangezien nagalase een lysosomaal enzym is, komt er dus extra nagalase vrij indien het aantal polynucleaire leukocyten sterk verhoogd is. Om dit aan te tonen wordt er een ROC-curve opgesteld met de stalen die een normaal aantal witte bloedcellen bevatten (zie Figuur 21). Van de 70 stalen blijven er dan nog 46 over om een nieuwe ROC-curve op te stellen.



Figuur 21: ROC-curve onderscheid prostaatkanker en controlegroep WBC <9000

Indien de AUC-waarde nu opnieuw wordt berekend bedraagt deze 0,604 (zie Tabel 9). Ook de P-waarde is nu gedaald, echter nog steeds niet genoeg om te besluiten dat er een significant verschil is (zie Tabel 10). Het is duidelijk dat nagalase nog steeds geen ideale parameter is om prostaatkanker op te volgen, maar er is wel aangetoond dat rekening moet gehouden worden met storende factoren zoals het aantal witte bloedcellen.

Tabel 10: Gegevens ROC-curve nagalase en prostaatkanker WBC <9000

Variabele	Nagalaseactiviteit
Aantal stalen	46
Aantal stalen prostaatkanker	19
Aantal stalen prostatectomie	27
AUC	0,604
P-waarde (significantie)	0,2560

6.3.3 Overige carcinomen

Naast prostaatkanker worden ook stalen van borst-, pancreas- en ovariumkanker getest. Deze worden opgespoord aan de hand van de respectievelijke tumormerkers CA 1.53, CA 1.99 en CA 1.25. De stalen hiervan worden telkens vergeleken met een controlegroep waarvan de hoeveelheid van de overeenkomstige tumormerker niet verhoogd is.

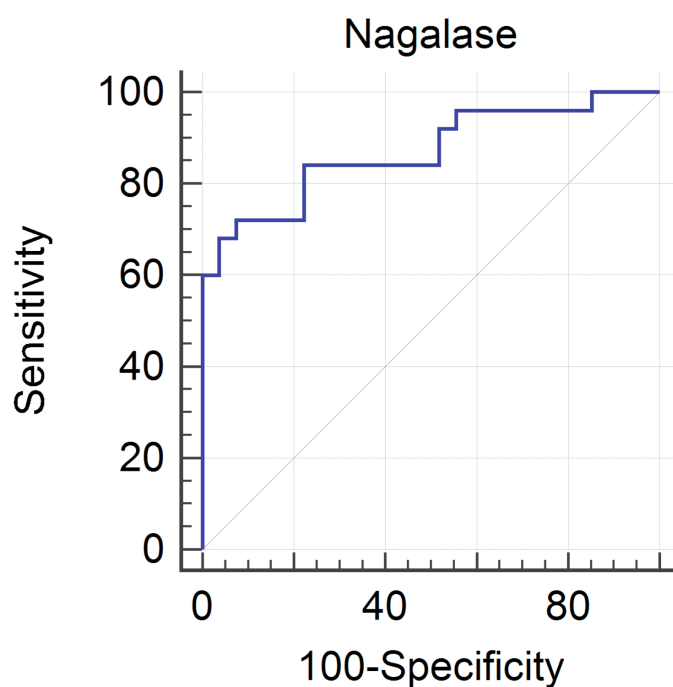
6.3.3.1 Borstkanker

Borstkanker wordt momenteel opgevolgd aan de hand van tumormerker CA 1.53. Er worden 25 stalen getest met een verhoogde CA 1.53-waarde en vergeleken met 27 stalen van een controlegroep. Aan de hand van de signalen van de FA die weergegeven zijn in Tabel 11 wordt een ROC-curve opgesteld (zie Figuur 22).

Tabel 11: Overzicht resultaten FA borstkanker

Staal nr.	CA 1.53-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	CA 1.53-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
1	Normaal	0,72	28	Verhoogd	1,14
2	Normaal	0,79	29	Verhoogd	1,14
3	Normaal	0,82	30	Verhoogd	0,87
4	Normaal	0,83	31	Verhoogd	0,22
5	Normaal	0,86	32	Verhoogd	0,47
6	Normaal	0,86	33	Verhoogd	0,64
7	Normaal	1,03	34	Verhoogd	1,00
8	Normaal	1,03	35	Verhoogd	0,81
9	Normaal	1,07	36	Verhoogd	0,60
10	Normaal	1,08	37	Verhoogd	0,60
11	Normaal	1,09	38	Verhoogd	0,69
12	Normaal	1,10	39	Verhoogd	0,78
13	Normaal	1,12	40	Verhoogd	0,71
14	Normaal	1,12	41	Verhoogd	0,71
15	Normaal	1,16	42	Verhoogd	0,64

Staal nr.	CA 1.53-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	CA 1.53-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
16	Normaal	1,20	43	Verhoogd	0,65
17	Normaal	1,22	44	Verhoogd	1,17
18	Normaal	1,27	45	Verhoogd	0,71
19	Normaal	1,27	46	Verhoogd	1,61
20	Normaal	1,35	47	Verhoogd	1,00
21	Normaal	1,44	48	Verhoogd	0,70
22	Normaal	1,54	49	Verhoogd	0,45
23	Normaal	1,59	50	Verhoogd	0,69
24	Normaal	1,62	51	Verhoogd	0,60
25	Normaal	1,65	52	Verhoogd	0,76
26	Normaal	1,79			
27	Normaal	1,89			



Figuur 22: ROC-curve onderscheid borstkanker en controlegroep

Door de software wordt berekend dat de AUC-waarde van deze test 0,870 bedraagt (zie Tabel 12). Deze AUC-waarde in combinatie met een zeer lage P-waarde toont aan dat er wel een significant verschil is met de controlegroep. Er mag dus voorzichtig geconcludeerd worden dat nagalase een goede parameter is voor de opvolging van borstkanker.

Tabel 12: Gegevens ROC-curve nagalase en borstkanker

Variabele	Nagalaseactiviteit
Aantal stalen	52
Aantal stalen borstkanker	25
Aantal stalen controlegroep	27
AUC	0,870
P-waarde (significantie)	<0,0001

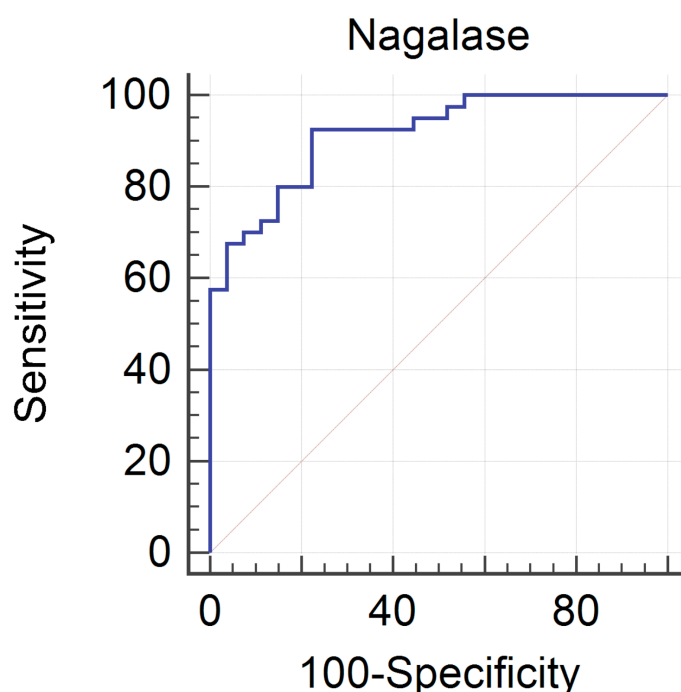
6.3.3.2 Pancreaskanker

De tumormerker die momenteel wordt gebruikt om pancreaskanker op te volgen is CA 1.99. Er worden 40 stalen getest met een verhoogde CA 1.99-waarde en deze worden vergeleken met 27 stalen van een controlegroep. Aan de hand van de signalen van de FA die weergegeven zijn in Tabel 13 wordt een ROC-curve opgesteld (zie Figuur 23).

Tabel 13: Overzicht resultaten FA pancreaskanker

Staal nr.	CA 1.99-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	CA 1.99-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
1	Normaal	0,72	28	Verhoogd	0,84
2	Normaal	0,79	29	Verhoogd	1,12
3	Normaal	0,82	30	Verhoogd	0,85
4	Normaal	0,83	31	Verhoogd	0,81
5	Normaal	0,86	32	Verhoogd	0,30
6	Normaal	0,86	33	Verhoogd	0,89
7	Normaal	1,03	34	Verhoogd	0,66
8	Normaal	1,03	35	Verhoogd	0,72
9	Normaal	1,07	36	Verhoogd	1,20
10	Normaal	1,08	37	Verhoogd	0,58
11	Normaal	1,09	38	Verhoogd	0,67
12	Normaal	1,10	39	Verhoogd	0,73
13	Normaal	1,12	40	Verhoogd	0,52
14	Normaal	1,12	41	Verhoogd	0,61
15	Normaal	1,16	42	Verhoogd	0,58
16	Normaal	1,20	43	Verhoogd	0,68
17	Normaal	1,22	44	Verhoogd	0,38
18	Normaal	1,27	45	Verhoogd	0,23
19	Normaal	1,27	46	Verhoogd	0,91
20	Normaal	1,35	47	Verhoogd	0,88
21	Normaal	1,44	48	Verhoogd	0,61

Staal nr.	CA 1.99-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	CA 1.99-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
22	Normaal	1,54	49	Verhoogd	0,60
23	Normaal	1,59	50	Verhoogd	0,78
24	Normaal	1,62	51	Verhoogd	0,23
25	Normaal	1,65	52	Verhoogd	1,13
26	Normaal	1,79	53	Verhoogd	0,62
27	Normaal	1,89	54	Verhoogd	0,50
			55	Verhoogd	1,02
			56	Verhoogd	0,85
			57	Verhoogd	0,20
			58	Verhoogd	0,69
			59	Verhoogd	0,38
			60	Verhoogd	0,82
			61	Verhoogd	0,40
			62	Verhoogd	0,42
			63	Verhoogd	0,96
			64	Verhoogd	0,56
			65	Verhoogd	0,69
			66	Verhoogd	0,73
			67	Verhoogd	0,47



Figuur 23: ROC-curve onderscheid pancreaskanker en controlegroep

Door de software wordt berekend dat de AUC-waarde van deze test 0,915 bedraagt (zie Tabel 12). Deze AUC-waarde in combinatie met een zeer lage P-waarde toont aan dat er wel een significant verschil is met de controlegroep. Er mag dus voorzichtig geconcludeerd worden dat nagalase een goede parameter is voor de opvolging van pancreaskanker.

Tabel 14: Gegevens ROC-curve nagalase en pancreaskanker

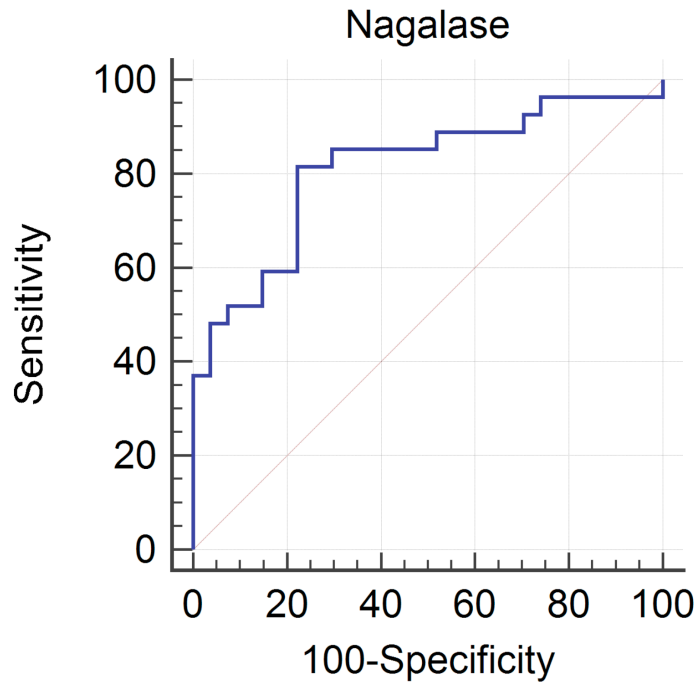
Variabele	Nagalaseactiviteit
Aantal stalen	67
Aantal stalen pancreaskanker	40
Aantal stalen controlegroep	27
AUC	0,915
P-waarde (significantie)	<0,0001

6.3.3.3 Ovariumkanker

De tumormerker die belangrijk is voor de opvolging van ovariumkanker is CA 1.25. Er worden 27 stalen getest met een verhoogde CA 1.25-waarde en deze worden vergeleken met 27 stalen van een controlegroep. Aan de hand van de signalen van de FA die weergegeven zijn in Tabel 15 wordt een ROC-curve opgesteld (zie Figuur 24).

Tabel 15: Overzicht resultaten FA ovariumkanker

Staal nr.	CA 1.25-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)	Staal nr.	CA 1.25-waarde	Nagalaseactiviteit (nmol/min.ml)
1	Normaal	0,72	28	Verhoogd	0,75
2	Normaal	0,79	29	Verhoogd	1,14
3	Normaal	0,82	30	Verhoogd	1,01
4	Normaal	0,83	31	Verhoogd	0,86
5	Normaal	0,86	32	Verhoogd	0,64
6	Normaal	0,86	33	Verhoogd	0,60
7	Normaal	1,03	34	Verhoogd	2,04
8	Normaal	1,03	35	Verhoogd	0,48
9	Normaal	1,07	36	Verhoogd	0,80
10	Normaal	1,08	37	Verhoogd	0,97
11	Normaal	1,09	38	Verhoogd	0,76
12	Normaal	1,10	39	Verhoogd	0,67
13	Normaal	1,12	40	Verhoogd	0,70
14	Normaal	1,12	41	Verhoogd	1,27
15	Normaal	1,16	42	Verhoogd	0,91
16	Normaal	1,20	43	Verhoogd	1,36
17	Normaal	1,22	44	Verhoogd	0,92
18	Normaal	1,27	45	Verhoogd	1,02
19	Normaal	1,27	46	Verhoogd	0,62
20	Normaal	1,35	47	Verhoogd	0,85
21	Normaal	1,44	48	Verhoogd	0,64
22	Normaal	1,54	49	Verhoogd	0,73
23	Normaal	1,59	50	Verhoogd	1,06
24	Normaal	1,62	51	Verhoogd	0,84
25	Normaal	1,65	52	Verhoogd	0,52
26	Normaal	1,79	53	Verhoogd	0,70
27	Normaal	1,89	54	Verhoogd	0,65



Figuur 24: ROC-curve onderscheid ovariumkanker en controlegroep

Door de software wordt berekend dat de AUC-waarde van deze test 0,812 bedraagt (zie Tabel 12). Deze AUC-waarde in combinatie met een zeer lage P-waarde toont aan dat er wel een significant verschil is met de controlegroep. Er mag dus voorzichtig geconcludeerd worden dat nagalase een goede parameter is voor de opvolging van ovariumkanker.

Tabel 16: Gegevens ROC-curve nagalase en ovariumkanker

Variabele	Nagalaseactiviteit
Aantal stalen	54
Aantal stalen ovariumkanker	27
Aantal stalen controlegroep	27
AUC	0,812
P-waarde (significantie)	<0,0001

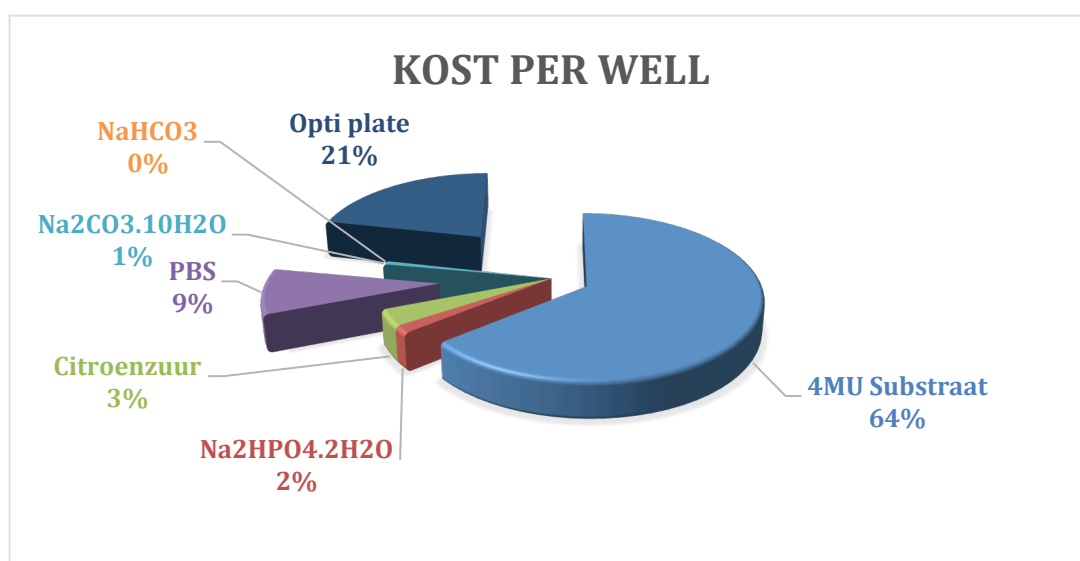
7 Kostenanalyse

Om de FA-test uit te voeren dienen volgende reagentia aangekocht te worden (zie Tabel 17). Als al deze bedragen opgeteld worden is dit een investering van 1416 euro. Eens deze investering gedaan is kunnen 4600 stalen geanalyseerd worden aan een kost van 13 eurocent per staal, met de aangekochte hoeveelheid substraat. Er dient wel opgemerkt te worden dat er bij elke 96-well plaat twee ijklijnen ingezet worden ter controle, een kost van 2,08 euro.

Tabel 17: Kostenanalyse FA-test

Producten	Aankoop	Totaal Volume (μ l)	Gebruikt (μ l) of (g)	Totaal Massa (g)	Effectieve kost	Procent
4MU Substraat	€ 390,00	23000	5		€ 0,0848	64,24
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	€ 52,40		0,038	1000	€ 0,0020	1,51
Citroenzuur	€ 199,20		0,022	1000	€ 0,0044	3,32
PBS	€ 166,00	1000000	70		€ 0,0116	8,80
Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O	€ 398,50		0,002	1000	€ 0,0008	0,60
NaHCO ₃	€ 74,50		0,001	1000	€ 0,0001	0,06
Opti plate	€ 136,00		1/96	50	€ 0,0283	21,47
Totaal	€ 1.416,60				€ 0,1320	100

Indien de bovenstaande bedragen worden uitgezet in een taartdiagram (Figuur 25) is het duidelijk dat aankoop van het substraat het meest doorweegt op het kostenplaatje per test. Dit is logisch aangezien het substraat duur is per eenheid en er per test veel van nodig is. De aankoop van de 96-well plaat maakt 20% uit van de investering. Het verbruik van de overige reagentia per test is laag en dragen zo goed als niet bij aan het kostenplaatje.



Figuur 25: Kostenverdeling per well FA-test

8 Besluit

Door een literatuurstudie uit te voeren werden er 3 mogelijke methoden geselecteerd om nagalaseactiviteit in humaan serum te bepalen. Het is gelukt om een methode te ontwikkelen om de nagalaseactiviteit in patiëntensera te bepalen, via een FA. De methode is werkzaam en efficiënt qua kosten en analyseduur.

Met de ontwikkelde methode was het mogelijk om het verband tussen nagalase en enkele aandoeningen te onderzoeken. Uit de resultaten van deze masterproef blijkt dat nagalase geen goede parameter is om prostaatkanker op te volgen, hoewel dit wel beschreven staat in de literatuur. Een algemeen storende factor bij de bepaling van nagalase is de hoeveelheid witte bloedcellen in het serum van de patiënt. Dit verband moet in de toekomst verder onderzocht worden, om nagalase met zekerheid te kunnen uitsluiten voor de opvolging van prostaatkanker. Er mag wel geconcludeerd worden dat nagalaseactiviteit kan gebruikt worden bij de opvolging van borst-, pancreas- en ovariumkanker en bij patiënten die een alcoholprobleem hebben. Uit de meetresultaten blijkt dat de nagalaseactiviteiten in de sera van de kankerpatiënten lager liggen dan deze van de controlegroep, in tegenstelling tot de verwachtingen. Een andere vaststelling is dat de Gc-globulineconcentraties in deze patiëntensera wel verhoogd zijn. Een mogelijke verklaring is dat Gc-globuline de werking van nagalase inhibeert, waardoor nagalase geen substraat meer kan omzetten. Dit werkt als een soort uitschakelmechanisme van ons lichaam tegen nagalase. Om deze hypothese te staven zijn echter wel bijkomende testen nodig. Een lagere nagalaseactiviteit wijst ook niet automatisch op een lagere nagalaseconcentratie, want de nagalaseconcentratie is de som van zowel actief nagalase als inactief nagalase. Maar via de nagalaseactiviteit in de sera van deze patiënten kan het effect van de specifieke behandeling in de tijd wel opgevolgd worden.

Nu blijkt dat nagalase een geschikte parameter is voor de opvolging van een aantal tumortypen en alcoholmisbruik kan er in de toekomst onderzocht worden of dit ook niet het geval is voor andere aandoeningen. Andere carcinomen, autismespectrumstoornissen en virale infecties komen hiervoor misschien in aanmerking. De gevonden correlatie tussen nagalaseactiviteit en borst-, pancreas- en ovariumkanker kan ook een nieuw licht werpen op de opvolging van de behandeling van deze kankers.

Bibliografie

- Abbas , S., Linseisen , J., Slanger , T., Kropp , S., Mutschelknauss , E. J., Flesch-Janys , D., et al. (2008). The Gc2 Allele of the Vitamin D Binding Protein Is Associated with a Decreased Postmenopausal Breast Cancer Risk, Independent of the Vitamin D Status. *American Journal Of Epidemiology* , S96-S96.
- Al-Kady , A. S., Ahmed , E.-S. I., Gaber , M., Hussein , M. M., & Ebeid , E.-Z. M. (2011). Kinetics of catalyzed hydrolysis of 4-methylumbelliferyl caprylate (MUCAP) salmonella reagent. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* , 1540-1545.
- Borges, C. R., & Rehder , D. S. (2016). Glycan structure of Gc Protein-derived Macrophage Activating Factor as revealed by mass spectrometry . *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 167-179.
- Bradstreet , J. J., Vogelaar , E., & Thyer , L. (2012). Initial Observations of Elevated Alpha-N-Acetylgalactosaminidase Activity Associated with Autism and Observed Reductions from GC Protein—Macrophage Activating Factor Injections. *Autism Insights* , 31 - 38.
- Brady , R. O. (2010). Fabry Disease – An Overview. In D. Elstein, G. Altarescu, & M. Beck, *Fabry Disease*. New York: Springer.
- Cheng, Z., Wu, X., Cheng, J., & Liu, P. (2017). Microfluidic fluorescence-activated cell sorting (μ FACS) chip with integrated piezoelectric actuators for low-cost mammalian cell enrichment. *Microfluidics and Nanofluidics* , 1-11.
- Engelborghs, Y., & Visser, A. J. (2014). Fluorescence Spectroscopy and Microscopy: Methods and Protocols. Humana Press.
- Fawcett, T. (2006). An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* (27(8)), 861-874.
- Ferreira, C. R., & Gahl, W. A. (2017). Lysosomal Storage Diseases. In E. Gilbert-Barness, L. A. Barness, & P. M. Farrell, *Metabolic Diseases: Foundations of Clinical Management, Genetics, and Pathology* (pp. 367 - 440). Amsterdam: IOS Press.
- Gregory, K. J., Zhao, B., Bielenberg, D. R., Dridi, S., Wu, J., Jiang, W., et al. (2010). Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor Directly Inhibits Proliferation, Migration, and uPAR Expression of Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE* .
- Hegde, N. R., Rao, P. P., Bayry, J., & Kaveri, S. V. (2009). Immunotherapy of viral infections. *Immunotherapy* , 691-711.

Jahan-Tigh, R. R., Ryan, C., Obermoser, G., & Schwarzenberger, K. (2012). Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*, 1-6.

(2013). In E. B. Kelly, *Encyclopedia of Human Genetics and Disease*. Greenwood.

Midsci. (2015). *Products: Victor X Multi-label Microplate Readers*. Opgeroepen op 04 12, 2017, van Midsci: <https://midsci.com/victor-multilabel-plate-readers>

Mohamad, S. B., Nagasawa, H., Uto, Y., & Hori, H. (2002). Tumor cell alpha-N-acetylgalactosaminidase activity and its involvement in GcMAF-related macrophage activation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1-8.

Nagasawa, H., Uto, Y., Sasaki, H., Okamura, N., Murakami, A., Kubo, S., et al. (2005). Gc Protein (Vitamin D-binding Protein): Gc Genotyping and GcMAF Precursor Activity. *Anticancer Research*, 3689-3695.

Neko, J. (2005). An illustration for the explanation of Receiver operating characteristic (ROC).

Ohkura, K., Nagasawa, H., Uto, Y., Okamura, N., Murakami, A., & Hori, H. (2006). The Role of Gc Protein Oligosaccharide Structure as a Risk Factor for COPD. *Anticancer Research*, 4073-4078.

Perkin Elmer. (2010). VICTORTM X Series Multilabel Plate Readers.

Pita, M., Cui, L., Gaikwad, R. M., Katz, E., & Sokolov, I. (2008). High sensitivity molecular detection with enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)-type immunosensing. *Nanotechnology*.

Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, S.-i., Doi, H., Kotani, M., Nakada, H., et al. (2003). Structural and immunocytochemical studies on alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease). *Journal of Human Genetics*, 1 - 8.

Sarbu, M., Munteanu, C. V., Dehelean, L., Petrescu, A. J., Peter-Katalinic, J., & Zamfir, A. D. (2015). Identification and structural characterization of novel O- and N-glycoforms in the urine of a Schindler disease patient by Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 1044-1056.

Schindler, D., & Desnick, R. J. (2015). Schindler Disease: Deficient-N-Acetylgalactosaminidase Activity. In R. N. Rosenberg, & J. M. Pascual, *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*. London: Elsevier Inc.

Strzelak , K., & Koncki , R. (2013). Nephelometry and turbidimetry with paired emitter detector diodes and their application for determination of total urinary protein. *Analytica Chimica Acta* , 68-73.

Thermo Fischer Scientific. (2017). ELISA technical guide and protocols. Rockford, USA.

Thewissen, B., Mijatovic, T., De Meirleir, K., & Bosmans, E. *Improved method for alpha-N-acetyl galactosaminidase (nagalase) testing revealed vvvv.*

Thyer , L., Ward , E., Smith , R., Branca , J. J., Morucci , G., Gulisano , M., et al. (2013). Gc protein-derived macrophage-activating factor decreases α -N-acetylgalactosaminidase levels in advanced cancer patients. *OncImmunity* , e25769.

Tomasic , I. B., Metcalf , M. C., Guce, A. I., Clark, N. E., & Garman , S. C. (2010). Interconversion of the Specificities of Human Lysosomal Enzymes Associated with Fabry and Schindler Diseases. *The Journal of biological chemistry* , 21560-6.

Yamamoto , N., & Urade , M. (2005). Pathogenic significance of α -N-acetylgalactosaminidase activity found in the hemagglutinin of influenza virus. *Microbes and Infection* , 674-681.

Yamamoto , N., Suyama , H., & Yamamoto , N. (2008). Immunotherapy for Prostate Cancer with Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor, GcMAF. *Translational Oncology* , 65 – 72 .

Yamamoto, N., & Urade, M. (2005). Pathogenic significance of α - N-acetylgalactosaminidase activity found in the hemagglutinin of influenza virus. *Microbes and Infection* , 674-681.

Yamamoto, N., Naraparaju, V. R., & Srinivasula, S. M. (1995). Structural Modification of Serum Vitamin D3-Binding Protein and Immunosuppression in AIDS Patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* , 1373-1378.

Yamamoto, N., Suyama, H., Nakazato, H., Yamamoto, N., & Koga, Y. (2008). Immunotherapy of metastatic colorectal cancer with vitamin D-binding protein-derived macrophage-activating factor, GcMAF. *Cancer Immunology, Immunotherapy* , 1007-1016 .

Zoga, M., Nikou, T., Ioannidis, A., Tzavellas, E., Paparrigopoulos, T., Lambrokostopoulos, K. T., et al. (2016). Alteration of α -N-acetylgalactosaminidase (nagalase) concentration in alcohol-dependent individuals without liver disease, during the detoxification therapy. *Drug and Alcohol Dependence* , 147-151.

Zweig, M. H., & Campbell, G. (1993). Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: A Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine. *Clinical chemistry* (39(4)), 561-77.

Bijlagen

BIJLAGE A: PROTOCOL ELFIA NAGALASE.....	65
BIJLAGE B: PROTOCOL FA NAGALASE	67
BIJLAGE C: PROTOCOL CONCENTRATIEBEPALING NAGALASE.....	69

Bijlage A: Protocol ELFIA nagalase

1. Reagentia

- Capture AL: Anti-NAGA, antibody produced in rabbit, purified immunoglobulin

- 100 µg oplossen in 1 ml PBS → 100 µg/ml (stockoplossing)
- Stockoplossing aliquoteren in 100 µl (bewaren in diepvries)
- Coatingconcentratie = 1 µg/mL → verdunnen in coatingsbuffer
→ volume = 150 µl/well → 150 x 100 wells = 1500 µl = 15 ml

- Coatingsbuffer: bicarbonaatbuffer 100 mM pH = 9,6

- Voor 1 l: 8,18 g Na₂CO₃·10H₂O
 6,0 g NaHCO₃
- Voor 100 ml: 0,818 g Na₂CO₃·10H₂O
 0,60 g NaHCO₃

- Blocking oplossing: 5% Tween 20 in PBS

- 5 ml Tween 20 oplossen in 95 ml PBS
- 2,5 ml Tween 20 oplossen in 47,5 ml PBS

- Wasbuffer: 0,05 % Tween 20 in PBS

- 0,05 ml Tween 20 oplossen in 100 ml PBS

- Substraatbuffer: fosfaat/citraatbuffer pH = 4,7

- Voor 100 ml: 3,263 g Na₂HPO₄·2H₂O
 1,921 g citroenzuur (C₆H₈O₇)
- Voor 50 ml: 1,632 g Na₂HPO₄·2H₂O
 0,961 g citroenzuur (C₆H₈O₇)

- Substraat: 4-Methylumbelliferyl-alpha-N-acetyl-D-galactosaminide

- Stockoplossing = 1 mM
- Werkoplossing = 0,15 mM
 - 1,5 ml stockoplossing oplossen in 8,5 ml substraatbuffer (hele plaat)
 - 0,3 ml stockoplossing oplossen in 1,7 ml substraatbuffer (voor 2 rijen)

2. Methode

Coaten plaat:

- pipetteer in elke well 150 μ l *capture* AB;
- incubeer overnacht bij 25°C op een schudder
- was plaat 3x
- klop plaat droog
- pipetteer in elke well 300 μ l *blocking* oplossing
- incubeer 1u bij 25°C
- was plaat 3x
- klop plaat droog.

Meting:

- dek ongebruikte wellletjes af
- pipetteer in elke well 100 μ l (20 μ l staal/standaard/controle + 80 μ l serum diluent) staal/standaard/controle
- incubeer 2u bij 37°C
- was plaat 3x
- klop plaat droog
- pipetteer in elke well 100 μ l verdunde substraatoplossing
- incubeer plaat 1u bij 37°C
- laat voor elke meting plaat schudden
- meet elke 3 minuten de emissie bij 460 nm.

Bijlage B: Protocol FA nagalase

1. Reagentia

- Bicarbonaatbuffer pH = 10

- Voor 50 ml: 0,52 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
0,32 g NaHCO_3

- Substraatbuffer: fosfaat/citraatbuffer pH = 4,7

- Voor 100 ml: 3,263 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,921 g citroenzuur ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- Voor 50 ml: 1,632 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,961 g citroenzuur ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)

- Substraat: 4-Methylumbelliferyl-alpha-N-acetyl-D-galactosaminide

- Stockoplossing = 1 mM
- Substraat nog 10x verdunnen tot 0,1 mM in PBS

- Stalen: telkens 2 maal verdunnen ook in PBS

2. Methode

Meting:

- pipetteer in elke well 50 μl staal-/standaardoplossing;
- pipetteer in elke well 50 μl substraatoplossing;
- incubeer plaat 2u bij 37°C;
- pipetteer in elke well 200 μl bicarbonaatbuffer om de reactie te stoppen;
- laat voor de meting de plaat schudden;
- meet de emissie bij 460 nm.

Bijlage C: Protocol concentratiebepaling nagalase

1. Reagentia

- *Pre-coated* 96-well plaat
- Nagalase-standaard
- Detectie reagens A
- Detectie reagens B
- TMB substraat
- Wasbuffer
- Standaard diluent
- *Assay diluent A*
- *Assay diluent B*
- Stop oplossing

2. Protocol

- pipetteer in elke well 100 μ L standaard, staal of blanco;
- incubeer 2u op 37°C;
- verwijder de vloeistof;
- pipetteer in elke well 100 μ L van detectie reagens A;
- incubeer 1u op 37°C;
- was de plaat 3x;
- pipetteer in elke well 100 μ L van detectie reagens B;
- incubeer 30 min op 37°C;
- was de plaat 3x;
- pipetteer in elke well 90 μ L substraat oplossing;
- incubeer 15-25 min op 37°C;
- pipetteer in elke well 50 μ L stop oplossing;
- meet de absorbanties bij 450 nm.

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:
Ontwikkeling van een FA-test voor het opsporen van nagalase in humanserum

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**
Jaar: **2017**

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.

Voor akkoord,

Van den Eynden, Mathias

Datum: **12/06/2017**