

2017 • 2018
Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis
Transformatie van Gc-globuline tot GcMAF

PROMOTOR :

ir. Myriam MEYERS

PROMOTOR :

ing. Bart THEWISSEN

COPROMOTOR :

Dhr. Eugène BOSMANS

Gudrun Conings

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



2017•2018

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Transformatie van Gc-globuline tot GcMAF

PROMOTOR :

ir. Myriam MEYERS

PROMOTOR :

ing. Bart THEWISSEN

COPROMOTOR :

Dhr. Eugène BOSMANS

Gudrun Conings

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie



KU LEUVEN

Woord vooraf

In kader van mijn opleiding als Industrieel Ingenieur in de biochemie heb ik stage gelopen in het bedrijf Epsilon Biotech, gelegen in Zonhoven. Gedurende 3 maanden heb ik onderzoek uitgevoerd naar de mogelijkheid om Gc-globuline te transformeren naar GcMAF met behulp van membraangebonden deglycosylerende enzymen op geactiveerde humane lymfocyten. Ik had geen betere afsluiter van mijn studiecarière kunnen wensen, graag wil ik dan ook een aantal mensen een extra woordje van dank toedienen voor de belangrijke rol die ze gespeeld hebben in het vervolledigen van mijn stageperiode en thesis.

Allereerst wil ik mijn externe promotors dhr. Eugène Bosmans en ing. Bart Thewissen bedanken voor de goede begeleiding gedurende mijn hele stageperiode, de kennis die zij mij hebben bijgebracht en de vele fijne momenten vol gelach en plezier op de werkvloer. Jullie hebben mij een onvergetelijke en leerrijke stageperiode bezorgd, daarvoor bedankt. Mijn dank gaat tevens uit naar mijn interne promotor ir. Myriam Meyers voor de steun en hulp bij het schrijven van deze thesis. Als laatste wil ik mijn medestudente Naomi Bongaerts bedanken, gedurende deze 3 maanden hebben we samen stage gelopen in Epsilon Biotech en vele fijne momenten samen mogen doorbrengen. Bedankt voor de vele onvergetelijke momenten en de grote steun die ik van jou heb mogen krijgen bij het bekomen van deze masterproef.

Inhoudsopgave

| | |
|--|-----------|
| Woord vooraf | 1 |
| Lijst van tabellen | 5 |
| Lijst van figuren | 7 |
| Verklarende woordenlijst | 9 |
| Abstract | 11 |
| Abstract in English | 13 |
| | |
| 1 Inleiding | 15 |
| 1.1 Situering..... | 15 |
| 1.2 Probleemopstelling | 15 |
| 1.3 Doelstelling | 16 |
| 1.4 Methode | 17 |
| | |
| 2 Gc-globuline | 19 |
| 2.1 Structuur van vitamine D ₃ -bindend proteïne..... | 19 |
| 2.2 Functies van het vitamine D ₃ -bindend proteïne | 21 |
| 2.2.1 Vitamine D ₃ -binding | 21 |
| 2.2.2 Actine scavenging | 22 |
| 2.2.3 Chemotaxis | 22 |
| | |
| 3 GcMAF | 23 |
| 3.1 Vorming Gc-macrofaagactiverend eiwit..... | 23 |
| 3.2 Macrofaag activatie | 24 |
| 3.3 Invloed van nagalase op de vorming van GcMAF | 25 |
| 3.4 Gebruik van GcMAF in therapie..... | 26 |
| 3.4.1 MS therapie | 26 |
| 3.4.2 Kanker therapie | 26 |
| | |
| 4 Materiaal en methode | 27 |
| 4.1 Materiaal | 27 |
| 4.1.1 Staalvoorbereiding | 27 |
| 4.1.2 Enzymactiviteitmetingen | 28 |
| 4.2 Methode | 31 |
| 4.2.1 Staalvoorbereiding | 31 |
| 4.2.2 β -galactosidase-enzymactiviteitmetingen..... | 32 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.3 | Neuraminidase-enzymactiviteitmetingen..... | 33 |
| 5 | Resultaten..... | 35 |
| 5.1 | β -galactosidase-enzymactiviteitmetingen | 35 |
| 5.1.1 | β -galactosidase-activiteitbepaling serumpool B | 35 |
| 5.1.2 | β -galactosidaseactiviteitbepaling van leukocyten na incubatie in 100% serumpool B..... | 35 |
| 5.1.3 | β -galactosidaseactiviteitbepaling van geïmmobiliseerde enzymen op de vaste drager Toyopearl bij incubatie in 100% serum | 38 |
| 5.1.4 | β -galactosidaseactiviteitbepaling van geactiveerde leukocyten met incubatie in 10% serum | 40 |
| 5.2 | Neuraminidase-enzymactiviteitmeting..... | 47 |
| 6 | Besluit..... | 55 |
| | Bibliografie..... | 57 |
| | Bijlagen | 65 |

Lijst van tabellen

| | |
|--|----|
| Tabel 1: Genotype en fenotype van Gc-globuline | 19 |
| Tabel 2: Gc fenotypen met specifieke suiker restgroepen | 21 |
| Tabel 3: β -galactosidase-enzymactiviteit bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C van celvrij serum en serum met niet-geactiveerde leukocyten of serum met PMA-geactiveerde leukocyten na variabele incubatietijd in 100% serum van serumpool B..... | 36 |
| Tabel 4: β -galactosidase-enzymactiviteit bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C van serum, afkomstig van serumpool B, zonder Toyopearl en serum, afkomstig van serumpool B, met Toyopearl beads na variabele incubatietijd in 100% serum van serumpool B | 38 |
| Tabel 5: De gemiddelde emissiesignalen, de berekende enzymactiviteiten uitgaande van de vijfparametervergelijking en de theoretische β -galactosidase-enzymactiviteit van de verdunningsreeks van standaardserumpool A bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C bekomen met het gebruik van Protocol C en Protocol D | 42 |
| Tabel 6: Membraangebonden β -galactosidase-enzymactiviteit op PMA-geactiveerde leukocyten bij pH 7 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C na variabele incubatietijd in 100% serumpool B, 10% serumpool B met PBS en 10% serumpool B met groeimedium KMEM/F-12 | 44 |
| Tabel 7: Gemeten en berekend fluorescentieverschil tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij verschillende hoeveelheden onverdund serumpool A aangelengd met PBS tot 20 μ l of 50 μ l met toevoegen van 80 μ l of 50 μ l natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μ l MUNANA-substraat. | 48 |
| Tabel 8: β -galactosidase-enzymactiviteit van serumpool B bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C | 65 |
| Tabel 9: Positie op microtiterplaat | 69 |
| Tabel 10: Positie op microtiterplaat | 74 |
| Tabel 11: Positie op microtiterplaat | 76 |

Lijst van figuren

| | |
|--|----|
| Figuur 1: Overzicht gebruikte enzymatische omzettingsmethode van serum Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF..... | 17 |
| Figuur 2: Aminozuurvolgorde van DBP waarbij elke letter een apart aminozuur voorstelt | 20 |
| Figuur 3: Functies van het complement systeem | 22 |
| Figuur 4: Deglycosylatie van verschillende Gc-globuline subtypes tot vorming van GcMAF | 23 |
| Figuur 5: Deglycosylatie van Gc-globuline en GcMAF door nagalase | 25 |
| Figuur 6: Afzondering van de buffy coat na centrifugatie | 27 |
| Figuur 7: Forbol-12-myristaat-13-acetaat | 28 |
| Figuur 8: Victor X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) | 28 |
| Figuur 9: Enzymatische hydrolyse van 4-MUGal door β -galactosidase | 29 |
| Figuur 10: Structuur van de grondtoestand van 4-MU in neutraal (a), zuur (b) en basisch (c) midden | 29 |
| Figuur 11: Excitatie- en emissiespectrum van 4-MU in verschillende mediumzuurtegraden | 30 |
| Figuur 12: Enzymatische hydrolyse van MUNANA door neuraminidase | 30 |
| Figuur 13: Microscopisch beeld van levende (A) en dode (B) leukocyten | 31 |
| Figuur 14: Relatieve β -galactosidase enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten met serum, niet geactiveerde leukocyten met serum en celvrij serum na variërende incubatietijden in 100% serumpool B op 37°C | 37 |
| Figuur 15: Relatieve β -galactosidase enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie met en zonder Toyopearl na variërende incubatietijden in 100% serumpool B op 37°C | 39 |
| Figuur 16: Ijckurve van standaardserumpool A bij gebruik van Protocol C (A) en Protocol D (B) | 43 |
| Figuur 17: Relatieve membraangebonden β -galactosidase-enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten na variërende incubatietijden op 37°C in 100% serum, 10% serum met PBS en 10% serum met groeimedium KMEM/F-12 ... | 45 |
| Figuur 18: Fluorescentieverschil, lineaire regressie en grenzen van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de gemeten fluorescentieverschillen tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij variërende hoeveelheden onverdund serumpool A aangelengd met PBS tot 20 μ l, toevoegen van 80 μ l natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μ l MUNANA-substraat | 49 |
| Figuur 19: Fluorescentieverschil, lineaire regressie en grenzen van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de gemeten fluorescentieverschillen tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij variërende hoeveelheden onverdund serumpool A aangelengd met PBS tot 50 μ l, toevoegen van 50 μ l natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μ l MUNANA-substraat | 50 |

| | |
|--|----|
| Figuur 20: Fluorescentieverschil, lineaire regressie en grenzen van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de gemeten fluorescentieverschillen tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij variërende lage hoeveelheden onverdund serumpool A (gaande van 0,0976 µl tot en met 3,13 µl) aangelengd met PBS tot 50 µl, toevoegen van 50 µl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 µl MUNANA-substraat | 51 |
| Figuur 21: Standaardcurve van 4-MU-verdunningsreeks (pH 6,5 en 37°C) bij excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 360 nm en 460 nm | 53 |
| Figuur 22: PMA verdunningsreeks..... | 67 |
| Figuur 23: Verdunningsreeks geïncubeerde staaloplossing en 100% serumpool B voor incubatie | 68 |
| Figuur 24: Standaardreeks serumpool A..... | 69 |
| Figuur 25: PMA verdunningsreeks..... | 71 |
| Figuur 26: Verdunningsreeks 10% serumpool B in PBS of groeimedium voor incubatie... | 72 |
| Figuur 27: Standaardreeks serumpool A..... | 73 |
| Figuur 28: Standaardreeks serumpool A..... | 75 |

Verklarende woordenlijst

| | |
|--------------------------------------|--|
| 4-MU | 4-methylumbelliferone |
| 1,25(OH) ₂ D ₃ | 1,25-dihydroxyvitamine D ₃ |
| 25(OH)D ₃ | 25-hydroxyvitamine D ₃ |
| 4-MUGal | 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside |
| DBP | vitamine D ₃ -bindend proteïne |
| GcMAF | gc-macrofaag activerende functie |
| MES | 2-(N-morpholino)ethaanzwavelzuur |
| MUNANA | 2-(4-methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminezuur |
| nagalase | α-N-acetylgalactosaminidase |
| PMA | forbol-12-myristaat-13-acetaat |
| PVDF | polyvinylideen difluoride |
| RBC | rode bloedcel(len) |
| TMB | 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine |
| WBC | witte bloedcel(len) |

Abstract

Gc-macrofaagactiverend eiwit (GcMAF), een plasmaproteïne gevormd na enzymatische deglycosylatie van Gc-globuline, beschikt over macrofaagactiverende eigenschappen waardoor het mogelijk toegediend kan worden als adjuvans voor het natuurlijk afweersysteem. Het doel van deze masterproef is onderzoeken of membraangebonden β -galactosidase en neuraminidase op humane lymfocyten inzetbaar zijn voor de in vitro transformatie van serum Gc-globuline tot GcMAF.

Leukocyten worden afgezonderd van vers citraatvolbloed, geactiveerd en gedurende variërende tijd geïncubeerd met humaan serum bij 37°C. De β -galactosidase- en neuraminidase-enzymactiviteit van celvrij serum en geïsoleerde leukocyten wordt bepaald door de emissiemeting van het fluorescerend product 4-methylumbelliferone dat vrijkomt door de enzymatische hydrolyse van het substraat 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside en 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminezuur door respectievelijk β -galactosidase en neuraminidase.

Een traag stijgende enzymexpressie van membraangebonden β -galactosidase op geactiveerde leukocyten wordt waargenomen na incubatie in 100% serum met slechts een geringe enzymactiviteitstijging van vrije enzymen in het serum. Optimalisatie van de methode voor het bepalen van de verandering in membraangebonden neuraminidase-enzymactiviteit na variërende incubatieperioden in serum is nog vereist voor het treffen van een conclusie over het gebruik van humane lymfocyten voor de in vitro transformatie van serum Gc-globuline tot GcMAF.

Abstract in English

Gc-macrophage activating protein (GcMAF) is a plasma protein formed by enzymatic deglycosylation of serum Gc-globulin. The protein features macrophage activating properties and can be used as an adjuvant to stimulate the natural immune system. This assay examines the possibility for the in vitro transformation of serum Gc-globulin to GcMAF with the use of membrane bound β -galactosidase and neuraminidase, located on the plasma membrane of activated human lymphocytes.

Leukocytes are isolated from fresh citrate whole blood samples, activated and incubated at 37°C in human serum for a various period of time. The enzyme activity of β -galactosidase and neuraminidase in cell free serum and isolated leukocytes are determined by measuring the fluorescent signal of 4-methylumbelliferone, formed by the enzymatic hydrolyses of the substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside and 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid by respectively β -galactosidase and neuraminidase.

The experiments show a slow increase in enzyme expression of membrane bound β -galactosidase on activated leukocytes after incubation in 100% serum with only a small activity change of free enzymes in the serum. Optimization of the method to determine the change in membrane bound neuraminidase enzyme activity after various period of incubation time in serum is still required to draw a conclusion about the use of human lymphocytes for the in vitro transformation of serum Gc-globulin to GcMAF.

1 Inleiding

1.1 Situering

Voor deze masterproef werd onderzoek uitgevoerd in Epsilon Biotech te Zonhoven, een kleinschalig bedrijf dat biochemisch onderzoek uitvoert in opdracht van derden. Andere biochemische bedrijven en instellingen leveren een projectvoorstel of probleemopzet aan Epsilon Biotech, waarna zij verdere testen uitvoeren.

In deze masterproef werd onderzoek uitgevoerd naar de transformatie van Gc-globuline tot GcMAF. Gc-globuline, ook wel vitamine D-bindend proteïne (DBP) genoemd, is een multifunctioneel plasmaproteïne behorende tot de albuminefamilie, dat gesynthetiseerd wordt in de lever [1], [2]. DBP heeft diverse functies in het menselijk lichaam waaronder transport en stockage van vitamine D, *scavenging* van extracellulaire G-actine, bevordering van de chemotaxische activiteit van C5a en macrofaag activatie. In het menselijk lichaam zijn drie subtypes van Gc-globuline te onderscheiden met name Gc1F, Gc1S en Gc2 welke onderling verschillen door de eindstandige suikers of suikerderivaten gebonden aan N-acetylgalactosamine (GalNAc) aanwezig op het aminozuur threonine uit Gc-globuline. De aanwezige suikerderivaten zijn galactose en siaalzuur voor Gc1F, galactose en α -mannose voor Gc1S terwijl Gc2 enkel over een eindstandige galactose geschikt [1].

Uitgaande van Gc-globuline kan het Gc-macrofaagactiverend eiwit (GcMAF) gesynthetiseerd worden door stapsgewijze enzymatische afsplitsing van de suikergroepen galactose door membraangebonden β -galactosidase op geactiveerde B-cellen, siaalzuur door membraangebonden neuraminidase aanwezig op geactiveerde T-cellen en α -mannose [1], [3]. GcMAF beschikt over macrofaagactiverende eigenschappen door binding via het vrijgekomen GalNAc met specifieke receptoren op macrofagen, waardoor macrofaagactivatie optreedt. Uitgaande van deze observatie kan GcMAF mogelijk toegediend worden als adjuvans voor het natuurlijk afweersysteem [4], [5].

1.2 Probleemopstelling

Door de macrofaag activerende werking van GcMAF is er een stijgende interesse in het therapeutisch gebruik als adjuvans voor het stimuleren van het natuurlijk afweersysteem. Om verder onderzoek te kunnen uitvoeren naar de specifieke eigenschappen en werking van GcMAF, dient er een methode op punt gesteld te worden voor het bekomen van grote hoeveelheden van dit macrofaagactiverend proteïne. Eerder onderzoek, uitgevoerd door Epsilon Biotech, toonde aan dat er slechts weinig enzymatische deglycosylatie van Gc-globuline optreedt bij gebruik van commercieel beschikbare extern toegevoegde enzymen gekoppeld aan de vaste drager Toyopearl AF-tresyl-650 (Sigma-Aldrich). Hierbij werd Gc-globuline (Statens Serum Institut, Kopenhagen) blootgesteld aan β -galactosidase van *Escherichia coli* grade VIII (Sigma-Aldrich), neuraminidase van *Clostridium perfringens* type V (Sigma-Aldrich) en α -mannosidase van *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich) voor de enzymatische omzetting van Gc-globuline naar GcMAF. Een kwalitatieve meting van GcMAF met behulp van ELISA toonde een lagere concentratie dan eerst verwacht werd.

Door het lage omzettingsrendement zoekt Epsilon Biotech naar een alternatieve methode voor de productie van GcMAF. Doordat bloedplasma een DBP concentratie van 6-7 μM bevat, zou humaan plasma een goed startproduct zijn voor het bekomen van GcMAF [6]. Bij deze masterproef wordt de mogelijkheid om serum Gc1F- en Gc2-globuline in vitro om te vormen tot GcMAF met behulp van membraangebonden β -galactosidase en neuraminidase op geïsoleerde B- en T-cellen onderzocht. De enzymatische activiteit van de deglycosylerende enzymen β -galactosidase en neuraminidase wordt bepaald met behulp van de Victor X4 Multilabel Plate Reader.

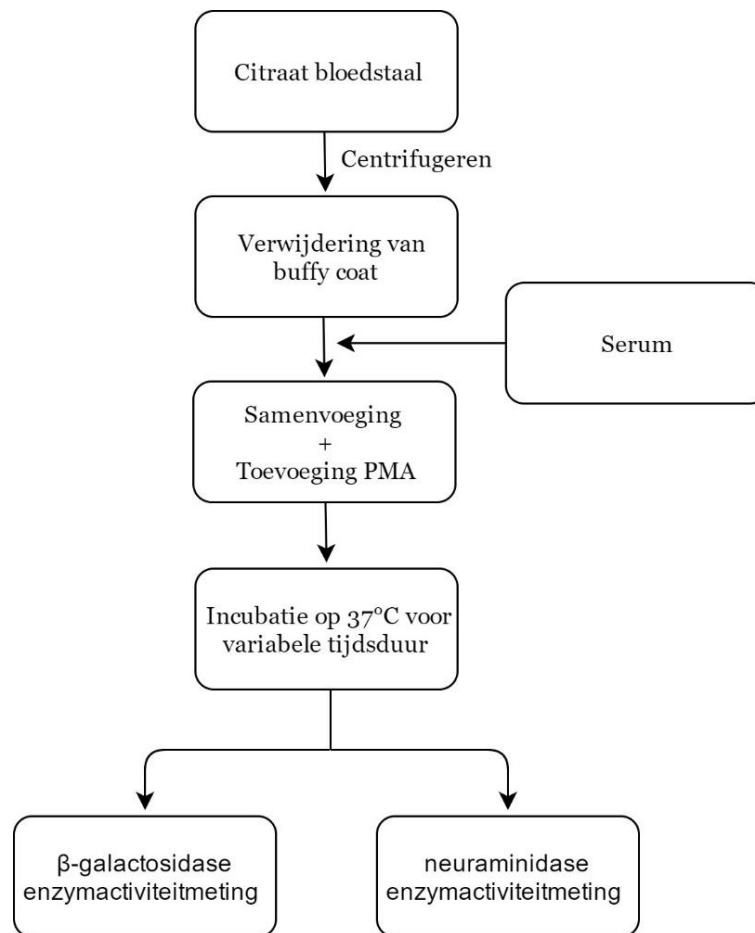
Mora-Montes *et al.* (2005) vermeldt de aanwezigheid van α -mannosidase in het endoplasmatisch reticulum en het golgi apparaat van humane cellen [7]. Er werd echter geen literatuur gevonden over de mogelijke expressie van membraangebonden α -mannosidase op geactiveerde leukocyten en wat het effect is van PMA op de enzymexpressie. Doordat er nog onzekerheid geldt over de aanwezigheid van α -mannosidase in geactiveerde leukocyten, werd in deze masterproef de omzetting van Gc1S-globuline naar GcMAF met behulp van α -mannosidase niet in rekening gebracht.

1.3 Doelstelling

Het doel van deze masterproef is onderzoeken of membraangebonden β -galactosidase en neuraminidase op PMA-geactiveerde humane lymfocyten inzetbaar zijn voor de in vitro transformatie van serum Gc-globuline tot GcMAF.

1.4 Methode

De gebruikte omzettingmethode van Gc-globuline naar GcMAF is opgebouwd uit meerdere stappen (Figuur 1).



Figuur 1: Overzicht gebruikte enzymatische omzettingmethode van serum Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF

De inspiratie voor de omzettingprocedure is afkomstig van het reeds uitgevoerde experiment van Kanan *et al.* (2000) [8]. Hierbij werd de transformatie van Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF in humane serumstalen onderzocht met behulp van deglycosylerende enzymen, aanwezig in het plasmamembraan van geïsoleerde en geactiveerde lymfocyten. Witte bloedcellen (leukocyten) worden afgezonderd uitgaande van vers citraatvolbloed. Na centrifugatie van het bloedstaal worden er drie fracties onderscheiden: een bovenste plasma laag, een tussenliggende buffy coat en een onderliggende rode bloedcellaag. Een constante hoeveelheid leukocyten, afkomstig van de buffy coat behandeld met ammoniumchloride voor het lyseren van de resterende rode bloedcellen, wordt toegevoegd aan een constant serumvolume, dat onder andere Gc1F- en Gc2-globuline bevat.

Verschillende artikels vermelden het positief effect van forbol-12-myristaat-13-acetaat (PMA) op de activatie van proteïne kinase C, een stimulerend proteïne voor de activatie en proliferatie van T- en B-cellen dat tevens kan zorgen voor een upregulatie van de enzymexpressie [9]–[14]. Om het effect van PMA op de expressie van neuraminidase en β -galactosidase te onderzoeken, worden de afgezonderde leukocyten geactiveerd met PMA waarna de verandering in enzymactiviteit van de deglycosylerende enzymen wordt onderzocht. PMA-geactiveerde leukocyten worden gedurende variërende tijdsduur met humaan serum geïncubeerd op 37°C waarna ze worden gecentrifugeerd voor het uitzakken van de leukocyten. Het serum wordt in een aparte proefbuis afgezonderd van de neergezakte lymfocyten. Een substraat voor de deglycosylerende enzymatische reacties wordt toegevoegd aan zowel het geïsoleerd serum als aan de lymfocyten.

Voor de activiteitmeting van neuraminidase en β -galactosidase wordt respectievelijk 2-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminezuur (Sigma-Aldrich) en 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (Carbosynth) als substraat toegevoegd. Neuraminidase splitst het fluorescerend product 4-methylumbelliferone (4-MU) enzymatisch af van het substraat, waarna de intensiteit wordt gemeten bij 460 nm [15]. β -galactosidase zorgt voor de hydrolyse van het substraat ter vorming van het fluorescerende 4-MU waarvan de intensiteit tevens wordt gemeten bij 460 nm [16]. Het fluorescent signaal van het gevormde product wordt gemeten met behulp van de Victor X4 Multilabel Plate Reader van PerkinElmer waarna de enzymactiviteit van de deglycosylerende enzymen in zowel serum als leukocyten kan worden bepaald met behulp van een vooropgestelde ijkcurve.

De verandering van membraangebonden β -galactosidase en neuraminidase op respectievelijk PMA-geactiveerde B- en T-cellen na incubatie in humaan serum, wordt bestudeerd. Uitgaande van de bekomen resultaten, kan een besluit getrokken worden over de mogelijkheid om geïsoleerde en geactiveerde leukocyten in te zetten voor de in vitro transformatie van Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF.

2 Gc-globuline

2.1 Structuur van vitamine D₃-bindend proteïne

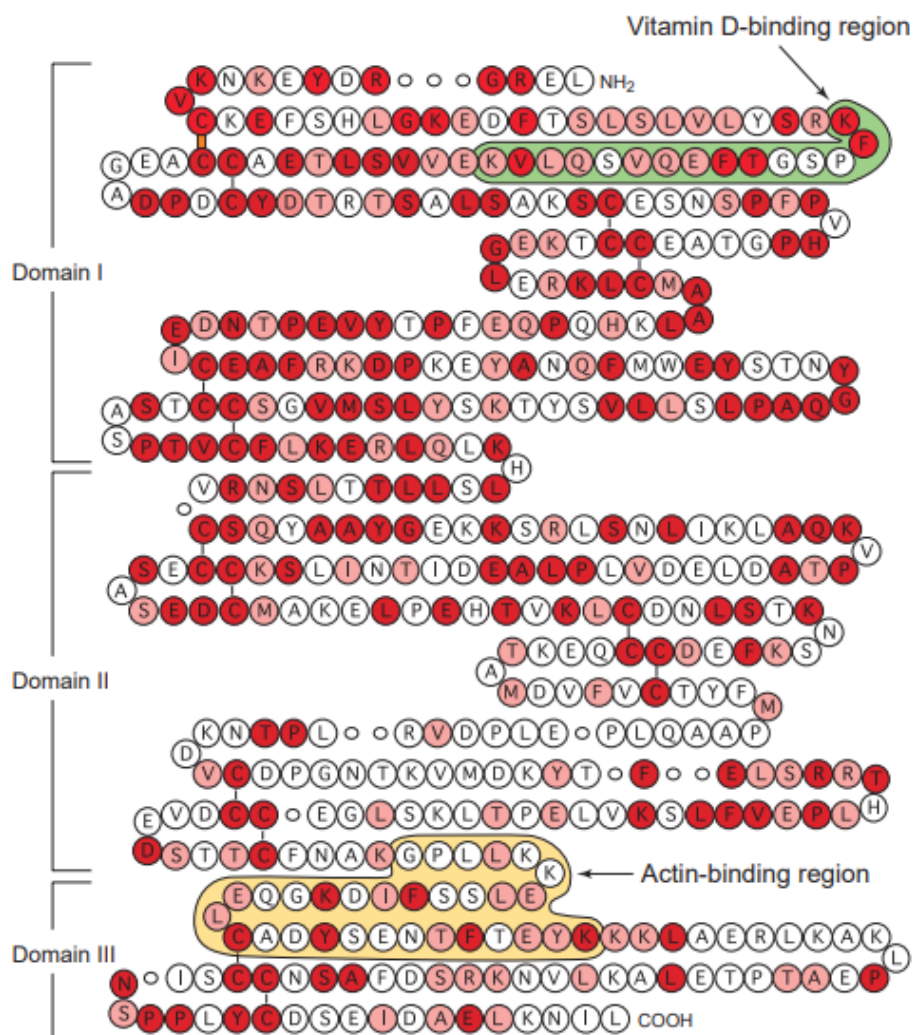
Het menselijk lichaam bevat een grote verscheidenheid aan proteïnen zowel in de weefsels als in de bloedsomloop, elk met hun eigen functie. Eén van de plasma proteïnen is het vitamine D₃-bindend proteïne (DBP) of humaan groep-specifieke component (Gc-globuline), gesynthetiseerd in de lever [1]. DBP behoort tot de albumine-eiwitfamilie, gecodeerd door de genensequentie gelegen op de band 4q11-q22 van het humaan chromosoom 4. De productie van het glycoproteïne wordt gecodeerd door drie allelen (Gc*2, Gc*1F en Gc*1S) waarbij genetische variaties binnen de basenpaarvolgorde voorkomen, wat zorgt voor meer dan 120 varianten van Gc-globuline binnen de menselijke populatie. De varianten worden onderverdeeld in verschillende genotypen, waaronder zes heterozygoten en drie homozygoten. Het humaan Gc-fenotype bestaat uit twee typen Gc1, namelijk Gc1S en Gc1F, en uit Gc2. Binnen het Gc-genotype is er één basepaar verschil tussen Gc1S en Gc1F terwijl er een zes basepaar verschil aanwezig is tussen Gc1S en Gc2 (Tabel 1) [1], [17], [18].

Tabel 1: Genotype en fenotype van Gc-globuline [1]

| Aminozuurpositie per allel | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | AZ 152 | AZ 311 | AZ 416 | AZ 420 |
| <i>Gc*1F</i> | GAA | AGA | GAT | ACG |
| <i>Gc*1S</i> | GAA | AGA | GAG | ACG |
| <i>Gc*2</i> | GGA | GAG | GAT | AAG |

| Aminozuurpositie per fenotype | | | | |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | AZ 152 | AZ 311 | AZ 416 | AZ 420 |
| <i>Gc1F</i> | Glu | Arg | Asp | Thr |
| <i>Gc1S</i> | Glu | Arg | Glu | Thr |
| <i>Gc2</i> | Gly | Glu | Asp | Lys |

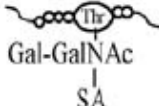
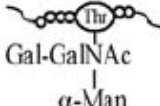

Door de specifieke aminozuurvolgorde van DBP wordt er een U-vormig molecuul gevormd, bestaande uit 458 aminozuursequenties, wat aanleiding geeft tot de vorming van een glycoproteïne van ongeveer 58 kDa. Het monomeer wordt onderverdeeld in drie domeinen, opgebouwd uit aminozuursequenties die aanleiding geven tot de vorming van specifieke bindingsplaatsen. De twee belangrijkste bindingsplaatsen van DBP zijn de vitamine D₃-bindende regio en de G-actine bindende regio, respectievelijk gelegen in het N-terminale domein (aminozuur 36 tot 49) en het C-terminale domein (aminozuur 373 tot 403) (Figuur 2) [2], [6]. De binding tussen vitamine D₃ en de vitamine D₃-bindende regio van DBP wordt bekomen met behulp van waterstofbindingen [19]. Het contact tussen actine en de G-actine bindende regio van DBP wordt opgebouwd uit waterstofbindingen en zoutbruggen [20].



Figuur 2: Aminozuurvolgorde van DBP waarbij elke letter een apart aminozuur voorstelt [2]

Afhankelijk van het humaan Gc-fenotype zijn er andere suikerrestgroepen aanwezig op aminozuur 420 of 418. Gc1F bevat een vertakte trisaccharide restgroep, bestaande uit een galactose (Gal) en een sialzuur (SA) gebonden aan één N-acetylgalactosamine (GalNAc) op het aminozuur threonine. Gc1S heeft, in vergelijking met Gc1F, een gelijkaardige suikerrestgroep waarbij galactose vervangen is door mannose. In tegenstelling tot de Gc1-fenotype bestaat de restgroep van Gc2 uit een disaccharide, opgebouwd uit GalNAc met een terminaal galactose (Tabel 2) [1].

Tabel 2: Gc fenotypen met specifieke suiker restgroepen [1]

| Gc Type | Gc1F | Gc1S | Gc2 |
|-----------------|---|---|---|
| | 418 or 420 | 418 or 420 | 418 |
| Oligosaccharide |  |  |  |

2.2 Functies van het vitamine D₃-bindend proteïne

Het vitamine D₃-bindend proteïne oefent verscheidene functies uit in het menselijk lichaam waaronder de binding van vitamine D₃, de verwijdering van actine filamenten uit de bloedcirculatie door *actine scavenging* en de bevordering van chemotaxis bij een ontstekingsreactie.

2.2.1 Vitamine D₃-binding

DBP is een primair *carrier* eiwit dat 80-90% van het totaal circulerende vitamine D₃ en zijn metabolieten in de bloedcirculatie, waaronder 25-hydroxyvitamine D₃ [25(OH)D₃], bindt en transporteert [21]. Door de hoge affiniteit van 25(OH)D₃ voor DBP, worden vrijwel al (80-90%) deze vitamine D₃-metabolieten in de bloedbaan gebonden aan het proteïne. Een groot deel van het DBP in het plasma komt echter voor in niet-gebonden toestand, slechts 5% van de bindingsplaatsen op DBP zijn bezet met vitamine D₃-metabolieten. De grote aanwezigheid van vrij DBP zorgt voor een bescherming tegen vitamine D₃ intoxicatie doordat het niet-gebonden DBP fungeert als een buffer voor een stijgende concentratie van vitamine D₃-metabolieten [3].

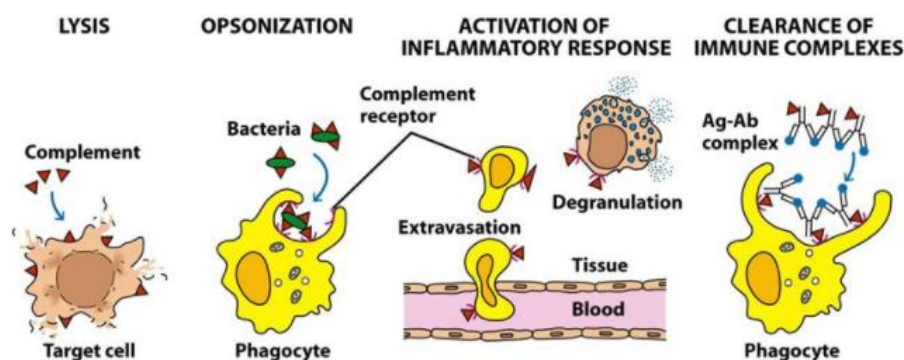
DBP bindt tevens het vitamine D₃-metaboliet 1,25-dihydroxyvitamine D₃ [1,25(OH)₂D₃], het actief vitamine D₃-metaboliet dat een rol speelt in calcium- en bot homeostase en betrokken is bij de regulatie van cel differentiatie en -proliferatie [22]. Om het urinaire verlies van het vitamine D₃-metaboliet te beperken, wordt 25(OH)D₃ in de bloedbaan opgenomen door de tubulaire niercellen waarna DBP voor de metabolische omzetting van 25(OH)D₃ naar 1,25(OH)₂D₃ zorgt [19].

2.2.2 Actine scavenging

Actine is een intracellulair proteïne en een belangrijke bouwsteen van het microfilament systeem, een cytoskeletstructuur die instaat voor celbeweging en –contractie [23]. Actine komt voor in twee moleculaire vormen, als globulair monomeer (G-actine) en als filamenteus polymeer (F-actine). Bij weefselschade of celdood wordt G-actine vrijgezet in de bloedcirculatie waarna het G-actine polymeriseert tot F-actinefilamenten, wat kan leiden tot vasculaire obstructie en orgaanfalen [3]. Gc-globuline is een actinebindend proteïne dat een binding kan aangaan met het vrij G-actine in de bloedbaan. DBP en gelsoline werken samen voor het verwijderen van de actinefilamenten uit de bloedcirculatie, een proces dat bekend staat als het *actine-scavenging* systeem. Gelsoline bindt F-actine en depolymeriseert de filamenten tot de vorming van losse G-actinemonomeren. Om te voorkomen dat het G-actine repolymeriseert tot de vorming van nieuwe F-actinepolymeren, wordt het vrije G-actine gebonden aan DBP waarna het gevormde complex wordt verwijderd uit het lichaam, hoofdzakelijk door hepatische filtratie [23].

2.2.3 Chemotaxis

In het vroege stadium van een inflammatoir proces treedt er activatie op van het complementsysteem als respons op de aanwezigheid van lichaamsvreemde componenten. Geactiveerde complementcomponenten zorgen voor opsonisatie, verwijdering van immuuncomplexen, activatie van de inflammatoire respons en het opwekken van cytotoxiciteit in de geïnfecteerde cellen met behulp van het membraan-attack-complex (Figuur 3). Tijdens complementactivatie worden C5a en C3a anafylatoxinen geproduceerd, complementpeptiden die interageren met cellulaire componenten om het inflammatieproces te bevorderen [24], [25]. Het anafylatoxine C5a zorgt voor de aantrekking en activatie van inflammatoire cellen zoals neutrofielen, eosinofielen, monocyten, lymfocyten en macrofagen. Bij het activeren van immuuncellen worden granzymen en oxidanten vrijgegeven die het immuunsysteem helpen om infecties en ontstekingen te bestrijden [26].



Figuur 3: Functies van het complement systeem [27]

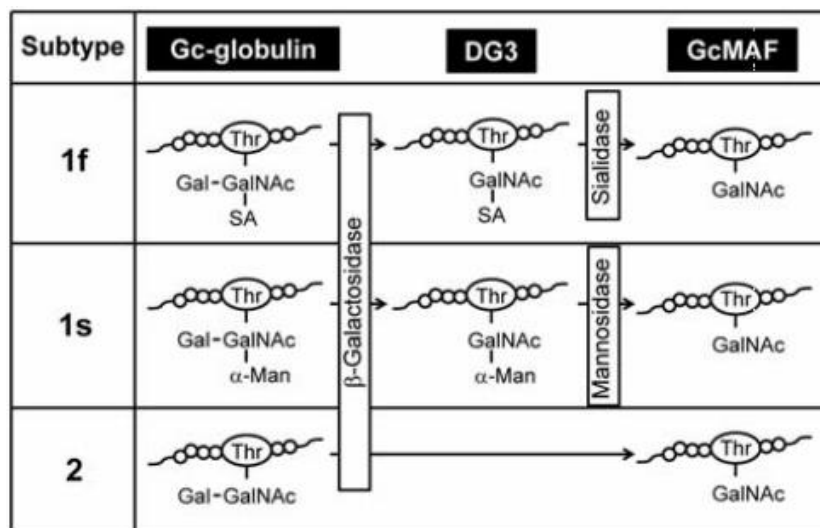
DBP speelt een belangrijke rol in de chemotaxis tijdens een ontstekingsreactie door binding met CD44, een chondroitinesulfaat-proteoglycaan gelokaliseerd op het plasmamembraan van neutrofielen dat functioneert als een celmembraan-receptor. DBP vormt, in samenwerking met annexin A2, een complex met CD44 waardoor de werking van het anafylatoxine C5a wordt bevorderd [28].

3 GcMAF

3.1 Vorming Gc-macrofaagactiverend eiwit

Het vitamine D₃-bindend proteïne kan in de aanwezigheid van lichaamsvreemde cellen en macromoleculen leiden tot de vorming van een afgeleid proteïne dat een directe activatie van macrofagen opwekt. Gc-macrofaagactiverend eiwit (GcMAF) wordt gevormd door stapsgewijze modificatie van de suikergroepen aanwezig op de verschillende subtypen van het Gc-globuline [2].

De productie van GcMAF uitgaande van het Gc1F-globuline wordt bekomen door de enzymatische afsplitsing van Gal door β -galactosidase, aanwezig op geactiveerde B-cellen, gevolgd door het enzymatisch verwijderen van sialzuur door neuraminidase (sialidase), gelokaliseerd op de geactiveerde T-cellen. De restgroep van Gc2-globuline is opgebouwd uit een disacharide waarbij enzymatische afsplitsing van het terminaal galactose door β -galactosidase resulteert in de vorming van GcMAF (Figuur 4) [1]–[3], [5], [17], [29]–[31].



Figuur 4: Deglycosylatie van verschillende Gc-globuline subtypes tot vorming van GcMAF [30]

α -mannosidase en β -galactosidase zijn exoglycosidasen die zorgen voor de hydrolyse van de β -glycosidische binding tussen respectievelijk een galactose of een α -mannose en zijn organische restgroep [32], [33]. β -galactosidase is opgebouwd uit een tetrameer van vier identieke polypeptideketens, elk van 1023 aminozuren lang. De bindingsplaats voor galactose bestaat uit twee monomeren waarbij de individuele monomeren van het enzym geen enzymatische hydrolyse van galactose-eenheden kunnen uitvoeren. [34], [35].

Neuraminidase of sialidase is een exoglycosidase dat de glycosidische binding tussen terminale sialzuurgroepen en zijn organische restgroep hydrolyseert [36], [37]. Vier soorten sialidase, Neu-1 tot -4, zijn waargenomen in dierlijke cellen waarbij enkel het lysosomale Neu-1 en het plasmamembraangeassocieerde Neu-3 aanwezig zijn in geactiveerde humane T-lymfocyten. Het lysosomale sialidase speelt een rol in de desialisatie van glycoproteïnen en glycolipiden in lysosomen maar is tevens aanwezig op het plasmamembraan van T-cellen. Neu-3 is geassocieerd met het plasma membraan van T-lymfocyten en zorgt voor de hydrolyse van sialzuur van extracellulaire proteïnen [38].

Activatie van T-lymfocyten resulteert in een noemenswaardig grotere aanwezigheid van Neu-1 mRNA en een lichte stijging in mRNA van Neu-3 ten opzichte van de niet-geactiveerde T-cellen. De grotere transcriptie van Neu-1 mRNA in geactiveerde T-cellen resulteert in een stijgende expressie van plasmamembraan-geassocieerde Neu-1. Door de geringe transcriptiestijging van Neu-3 mRNA, treedt er slechts een lage stijgende expressie van Neu-3 op na T-lymfocytactivatie [36]–[39].

De deglycosylatie van Gc1F- en Gc2-globuline door β -galactosidase en neuraminidase resulteert in de vorming van GcMAF, een plasmaproteïne met analoge aminozuursequenties als DBP maar met een N-acetylgalactosamine (GalNAc) bevestigd op het aminozuur threonine [1], [3]. De terminale GalNAc van de suikerrestgroep van GcMAF is noodzakelijk voor het activeren en het verhogen van de fagocytische en antitumorale activiteit van macrofagen [28].

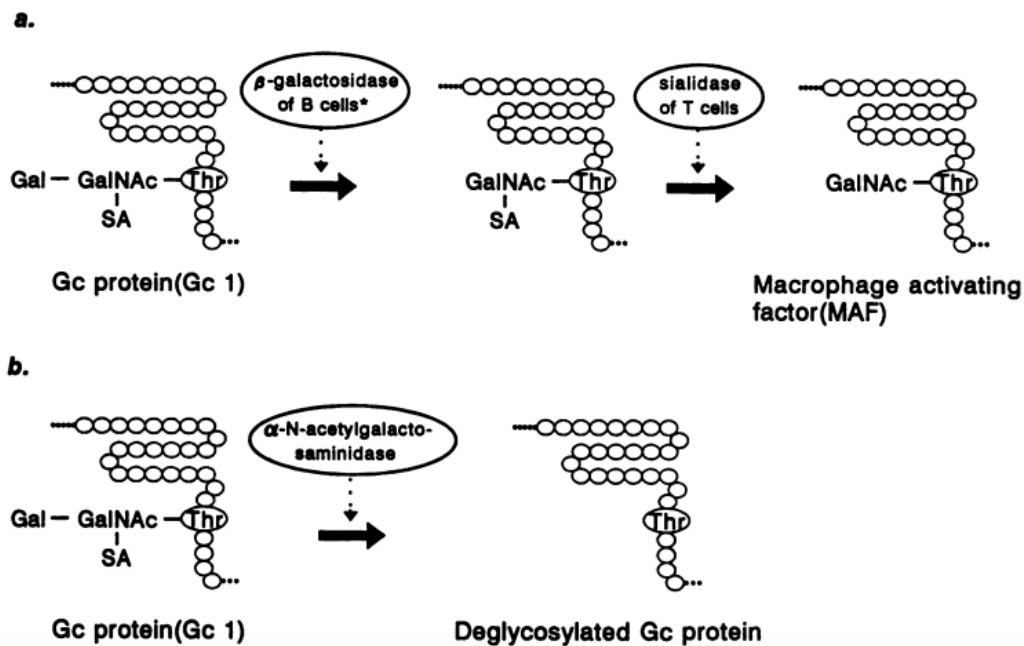
3.2 Macrofaag activatie

Om een beeld te verkrijgen over het achterliggende mechanisme van macrofaagactivatie door GcMAF, dient er verder onderzoek uitgevoerd te worden naar de intracellulaire pathway die GcMAF opwekt na contact met macrofaag receptoren.

Tot op de dag van vandaag is er slechts weinig gekend over de GcMAF intracellulaire signalering in macrofagen door het gebrek aan verder onderzoek omwille van het lage aanbod en hoge kostprijzen van commercieel verkrijgbare zuivere GcMAF [40]. Er wordt gesuggereerd dat macrofaagactivatie optreedt door interactie van GcMAF met een C-type lectinereceptor op het macrofaagplasmamembraan. De receptor herkent het eindstandige GalNAc aanwezig op GcMAF en zorgt, na specifieke interactie, voor het starten van de macrofaagactivatie-pathway [41]. C-type lectines zijn Ca^{2+} -afhankelijke proteïnen die, bij aanwezigheid in het plasmamembraan, specifieke suikergroepen met een grote affiniteit herkennen. Ze fungeren als signaalreceptor bij vele immuunreacties zoals inflammatie, immuniteit voor tumoren en virus geïnfecteerde cellen [42]. De exacte signalisatieroute van de macrofaagactivatie is nog niet achterhaald en verder onderzoek is gewenst. Om de effecten van GcMAF op de macrofaagactivatie te kunnen bestuderen, is er nood aan zuivere GcMAF.

3.3 Invloed van nagalase op de vorming van GcMAF

Bij verschillende kankeronderzoeken werd een verband waargenomen tussen de activiteit van het lysosomaal enzym α -N-acetylgalactosaminidase (nagalase) en het dalend effect van de macrofaagactivatie door GcMAF [43]–[45]. Yamamoto *et al.* (1996) verklaarde de dalende GcMAF-activiteit door de volledige deglycosylatie van plasma Gc-proteïne door nagalase [46]. Hierbij werd gesuggereerd dat de O-glycosidische binding tussen het terminale α -GalNAc suiker en het aminozuur threonine van Gc-globuline en GcMAF wordt herkend en gehydrolyseerd door nagalase (Figuur 5). Dit leidt tot een verminderde productie van GcMAF uit DBP met een daling in macrofaagactivatie als gevolg.



Figuur 5: Deglycosylatie van Gc-globuline en GcMAF door nagalase [46]

Recenter onderzoek, uitgevoerd door Douglas *et al.* (2009), heeft echter aangetoond dat er evenveel Gc-proteïne met een trisaccharide bevestigd op Thr420 teruggevonden wordt bij kankerpatiënten als bij gezonde personen [47]. Dit is tegenstrijdig met de hypothese van Yamamoto *et al.* (1996) en suggereert dat nagalase geen volledige deglycosylatie van Gc-proteïne veroorzaakt, zoals gesuggereerd werd door Yamamoto *et al.* (1996), maar dat de dalende GcMAF-activiteit bij verhoogde nagalase-expressie te wijten is aan een andere oorzaak. De manier waarop nagalase voor een dalende GcMAF-activiteit zorgt, is tot op de dag van vandaag nog steeds niet achterhaald. Verder onderzoek is noodzakelijk voor een éénduidige verklaring te geven aan het effect van nagalase op de macrofaagactivatie van GcMAF.

3.4 Gebruik van GcMAF in therapie

Door de macrofaagactiverende werking van GcMAF is er een stijgende interesse in het therapeutisch gebruik als adjuvans voor het natuurlijk immuunsysteem. Het gebruik van GcMAF als extra stimulatieve behandeling bij immuunresponsen tegen verschillende kankers en als therapie bij multiple sclerose, werd reeds verder bestudeerd in verschillende onderzoeken [4], [5].

3.4.1 MS therapie

Multiple Sclerosis (MS) is een auto-immuunziekte waarbij destructie van de myeline schede, oligodendrocyten en axonen optreedt, wat aanleiding geeft tot irreversibele neurologische aandoeningen [48]. Toshio *et al.* (2016) beschrijft de resultaten van een GcMAF-behandeling op een Australische man, gediagnostiseerd met MS [4]. Doordat MS kan beschouwd worden als een auto-immuunaandoening, werd het gebruik van GcMAF als potentiële behandeling verder onderzocht. Tweemaal per week werd 0,5 ml GcMAF (1500 ng/0,5 ml) ingespoten bij de patiënt. Na een zes weken lange behandeling werd een duidelijke verbetering in de motoriek van de man waargenomen [4]. Door het gelimiteerd aantal onderzoeken dat is uitgevoerd op het effect van GcMAF als behandeling tegen MS, kan er echter geen eenduidige conclusie worden getrokken over het gebruik van GcMAF als MS-therapie.

3.4.2 Kanker therapie

Door de macrofaagactiverende functie van GcMAF is er een stijgende interesse voor het gebruik van GcMAF bij kankertherapie. Hierbij kunnen hoge hoeveelheden van GcMAF geïnjecteerd worden bij kankerpatiënten waardoor het aangeboren immuunsysteem wordt gestimuleerd. Verschillende studies zijn reeds uitgevoerd om het effect van GcMAF als therapeutische agent tegen kanker te bestuderen, eventueel in combinatie met chemotherapeutische behandelingen [5].

Een belangrijk aspect van kanker-immunotherapie is de inhibitie van angiogenese, een proces van bloedvatvorming in tumoren waardoor kankercellen worden voorzien van voedingsstoffen nodig voor proliferatie [49]. Angiogenese is van belang voor de progressie van kankercellen waarop verschillende chemotherapeutische componenten en immunotherapieën mogelijk een inhiberende werking kunnen uitoefenen [50]–[52]. Pacini *et al.* (2012) bestudeerde de inhiberende werking van GcMAF op de angiogenetische werking van het pro-inflammatoire prostaglandine E1 bij patiënten met chronische nierfalen ten gevolge van diabetes. In dit onderzoek werd vastgesteld dat GcMAF een anti-angiogenetische, macrofaagstimulerende en inflammatoire werking vertoont [53]. Bijkomend onderzoek op het positief effect van GcMAF als mogelijke behandeling tegen verschillende soorten kankers zoals long-, lever-, pancreas-, blaas-, ovariumkanker en plaveiselcelcarcinoom in de tong werden uitgevoerd. Ondanks de veelbelovende resultaten, staat het gebruik van GcMAF als kankertherapie nog steeds in de kinderschoenen waardoor er een grote noodzaak is aan verder onderzoek [54]–[57].

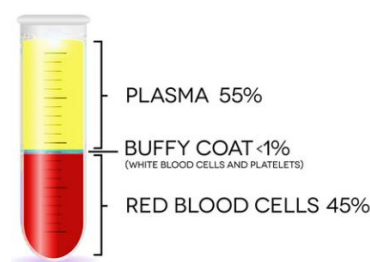
4 Materiaal en methode

4.1 Materiaal

4.1.1 Staalvoorbereiding

4.1.1.1 Ammoniumchloride lysisbuffer

Voor de transformatie van serum Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF via enzymatische deglycosylatie met membraangebonden neuraminidase en β -galactosidase op respectievelijk T- en B-lymfocyten, is er nood aan een zuivere leukocytenfractie. Vers citraatvolbloed wordt gecentrifugeerd voor het afscheiden van de buffy coat, een geconcentreerde fractie opgebouwd uit bijna alle witte bloedcellen (WBC) en bloedplaatjes van het bloedstaal, gelokaliseerd tussen de rode bloedcelfractie en de plasmafractie (Figuur 6) [58].

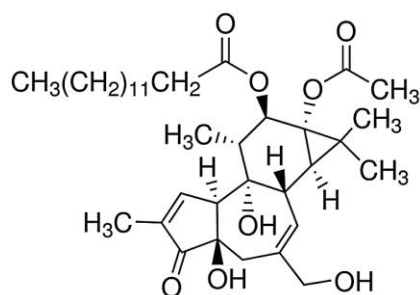


Figuur 6: Afzondering van de buffy coat na centrifugatie [59]

De tussenliggende witte bloedcellaag wordt afgezonderd met gebruik van een micropipet. Door het kleine volume aan buffy coat kan het mee afzonderen van een kleine fractie rode bloedcellen (RBC) niet vermeden worden. De aanwezigheid van de RBC zorgen voor het vermoelijken van de latere witte bloedceltelling en dienen bijgevolg gelyseerd te worden met behulp van een ammoniumchloride lysisbuffer. Het gebruik van een NH_4Cl -oplossing zorgt voor de lysis van RBC terwijl de leukocyten intact blijven [60]–[62].

4.1.1.2 Forbol-12-myristaat-13-acetaat

Voor het bekomen van een zo hoog mogelijke enzymatische deglycosylatie van Gc-globuline, dient activatie en proliferatie van de T- en B-cellen te worden geïnduceerd. Verscheidene artikels vermelden het positief effect van PMA op de activatie van proteïne kinase C, een proteïne dat een stimulerend effect uitoefent op de activatie en proliferatie van T- en B-cellen en tevens een upregulatie van de enzymexpressie van membraangebonden neuraminidase en β -galactosidase kan induceren [9]–[14]. PMA behoort tot de forbol esters, die gedefinieerd worden als polycyclische componenten waarin twee hydroxylgroepen op vicinale koolstofatomen (C12 en C13) veresterd zijn met vetzuren (Figuur 7) [63].



Figuur 7: Forbol-12-myristaat-13-acetaat [64]

4.1.2 Enzymactiviteitmetingen

4.1.2.1. Victor X4 Multilabel Plate Reader

De enzymactiviteit van membraangebonden neuraminidase en β -galactosidase op T- en B-cellen wordt bepaald via fluorescentiemetingen, uitgevoerd met de Victor X4 Multilabel Plate Reader van PerkinElmer (Figuur 8).

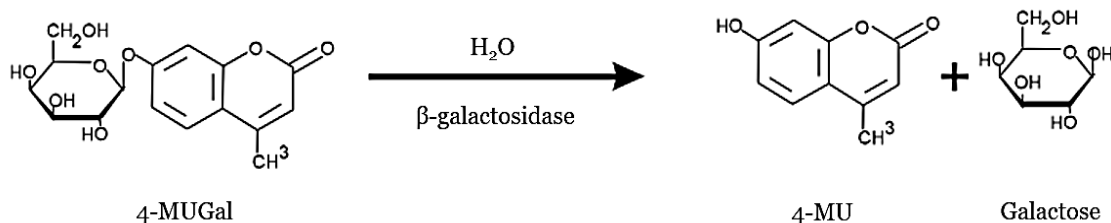


Figuur 8: Victor X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) [65]

De Victor X4 is uitgerust met een temperatuurfunctie voor het instellen van de optimale enzymatische reactietemperatuur en de aangebrachte microtiterplaat wordt automatisch geschud voor het bekomen van een optimaal contact tussen substraat en enzym. Met behulp van het softwarepakket Work Out kan de enzymactiviteit berekend worden uitgaande van een ijkcurve van de gemeten fluorescentiesignalen afkomstig van standaarden uit de standaardserumpool A met gekende enzymatische activiteit [66], [67]. De enzymactiviteiten van 100 stalen uit de standaardserumpool A worden gemeten waarna een gemiddelde activiteit wordt berekend. Een verdunningsreeks van de standaardserumpool A wordt bij elke enzymactiviteitmeting ingezet waarbij de fluorescentie van elke verdunning wordt gemeten na een welbepaalde reactietijd met het toegevoegde substraat. Een ijkcurve van de activiteit van de standaard verdunningen ten opzichte van de gemeten fluorescentie wordt opgesteld. Met behulp van de opgestelde ijkcurve wordt de gemeten fluorescentie van onbekende stalen omgezet naar de bijhorende enzymactiviteit.

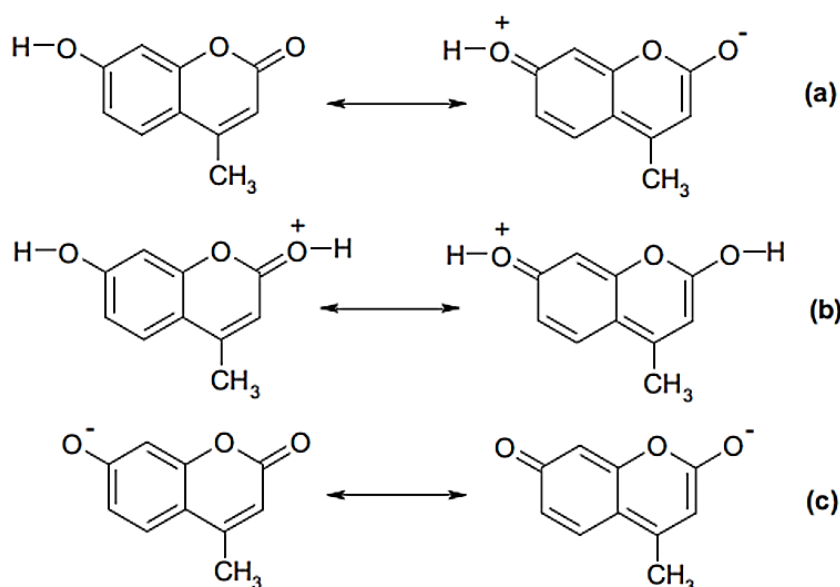
4.1.1.2. 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside

De β -galactosidase-enzymactiviteit wordt bepaald gebruik makende van het fluorogeen substraat 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (4-MUGal) aangekocht bij Sigma-Aldrich. β -galactosidase hydrolyseert de binding tussen galactose en 4-methylumbelliferone (4-MU) aanwezig in 4-MUGal waardoor het fluorescerend product 4-MU vrijkomt (Figuur 9).



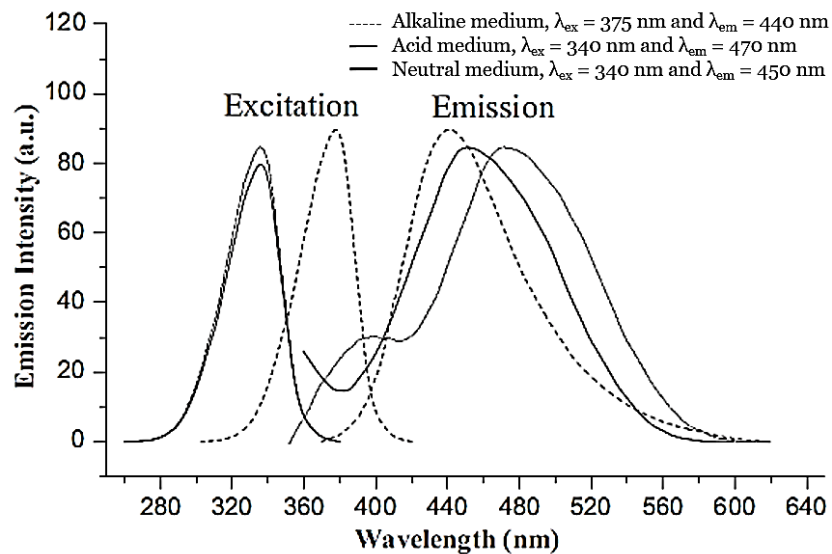
Figuur 9: Enzymatische hydrolyse van 4-MUGal door β -galactosidase [68]

Bestraling met licht van een specifieke golflengte zorgt voor de excitatie van elektronen in de aromatische 4-MU moleculen waarbij de elektronen worden aangeslagen naar hogere energieniveaus. Na een korte periode van excitatie treedt er terugval op van de aangeslagen toestand naar tussenliggende orbitalen door uitzending van een foton. Dit gaat gepaard met het uitzenden van fluorescent licht met een specifieke en hogere golflengte dan het licht waarmee de elektronen werden geëxciteerd. Afhankelijk van de zuurtegraad van het milieu waarin 4-MU zich bevindt, worden elektronen op andere posities van de aromatische structuur geëxciteerd (Figuur 10). Hierdoor is de golflengte van het uitgezonden fluorescent signaal afhankelijk van de zuurtegraad van het milieu waarin het substraat zich bevindt [69], [70].



Figuur 10: Structuur van de grondtoestand van 4-MU in neutraal (a), zuur (b) en basisch (c) midden [70]

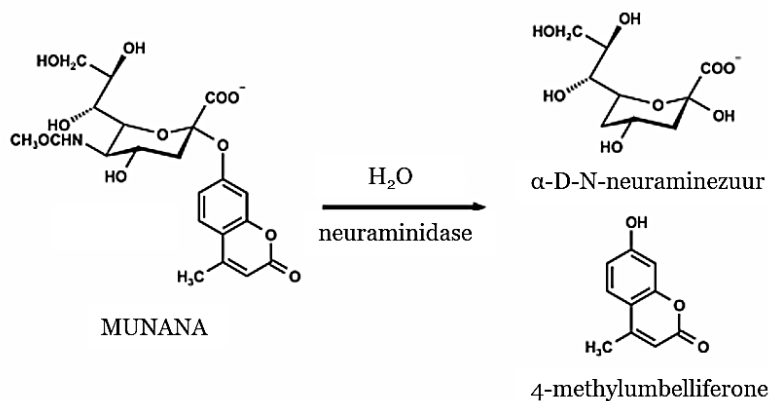
Voor het bekomen van de optimale pH condities, wordt er bij het uitvoeren van de β -galactosidaseactiviteitsmetingen gebruik gemaakt van een citraatfosfaatbuffer met pH 4,4. Het substraat 4-MUGal wordt toegevoegd aan alle microtiterwells en de microtiterplaat wordt geïncubeerd op 37°C, waarna de enzymatische reactie wordt beëindigd in alkalisch milieu (pH 8) door toevoeging van NaOH (0,250 M). Door de toevoeging van de base, wordt een basisch milieu bekomen waarbij 4-MU geëxciteerd wordt door licht met een specifieke golflengte van 375 nm. De maximale emissiepiek van het product 4-MU in basisch milieu is gelegen bij 440 nm (Figuur 11). De emissiesignalen worden gemeten bij een golflengte van 460 nm na excitatie door licht met een specifieke golflengte van 340 nm.



Figuur 11: Excitatie- en emissiespectrum van 4-MU in verschillende mediumzuurtegraden [70]

4.1.1.3. 2-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminezuur

De bepaling van de enzymatische activiteit van neuraminidase wordt uitgevoerd met behulp van het substraat 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminezuur (MUNANA). Neuraminidase, gelokaliseerd in het plasmamembraan van geïsoleerde en geactiveerde T-cellen, hydrolyseert de binding tussen neuraminezuur en 4-methylumbelliferone aanwezig in MUNANA, waardoor het fluorochroom product 4-MU wordt vrijgegeven [71] (Figuur 12).



Figuur 12: Enzymatische hydrolyse van MUNANA door neuraminidase [71]

Voor de neuraminidase-enzymactiviteitmeting wordt gebruik gemaakt van een natriumcitraatoplossing (50 mM) met pH 8. Het fluorescentiesignaal wordt om de 3 minuten gedurende een totale reactietijd van 24 minuten gemeten bij 460 nm na excitatie door licht met een specifieke golflengte van 340 nm.

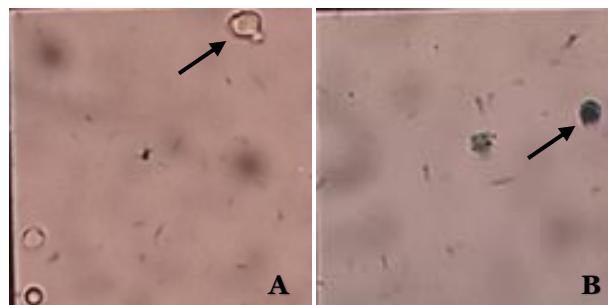
4.2 Methode

4.2.1 Staalvoorbereiding

Om onderzoek uit te voeren naar de enzymatische omzetting van serum Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF met membraangebonden enzymen op afgezonderde lymfocyten, is er nood aan een geïsoleerde en gezuiverde WBC fractie. Met behulp van een staalvoorbereiding worden de leukocyten afgezonderd uit vers citraatvolbloed, waarna verder wordt gezuiverd door lysis van de RBC en het wassen van de overblijvende WBC (Bijlage B: staalvoorbereiding).

Vers citraatvolbloed wordt gecentrifugeerd voor het bekomen van de verschillende bloedfracties. Met behulp van een micropipet wordt zoveel mogelijk buffy coat afgezonderd in aparte steriele proefbuizen van 15 ml, elk met een buffy coat volume van 1 ml. De proefbuizen worden volledig gevuld met ammoniumchloride lysisbuffer voor het lyseren van de RBC die mogelijks met de buffy coat mee werden afgezonderd. De oplossing wordt opnieuw gecentrifugeerd waarna het supernatant wordt verwijderd. De overgebleven cel fractie wordt vervolgens drie maal gespoeld met een fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) met pH 7 waarbij de cellen in suspensie worden gebracht. Na goede menging van de suspensie, wordt de cel fractie opnieuw afgezonderd door het verwijderen van het supernatant na centrifugatie.

Na het wassen van de WBC wordt de gezuiverde cel fractie terug in suspensie gebracht door toevoeging van het groeimedium Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) van Thermo Fisher. De vitaliteit van de cellen wordt nagegaan door kleuring met Trypan blue waarna het microscopisch beeld van de cellen wordt bestudeerd. Levende cellen blijven kleurloos terwijl de dode cellen blauw verkleuren na toevoeging van Trypan blue (Figuur 13). Indien er bij het microscopisch beeld hoofdzakelijk levende cellen wordt waargenomen, worden de cellen bewaard op 37°C tot verdere analyse wordt uitgevoerd.



Figuur 13: Microscopisch beeld van levende (A) en dode (B) leukocyten

4.2.2 β -galactosidase-enzymactiviteitmetingen

Het effect van PMA op de expressie van plasmamembraangebonden β -galactosidase op B-cellen wordt onderzocht door het analyseren van de verandering in enzymactiviteit in functie van de incubatietijd in humaan serum. Serum, afkomstig van de serumpool B met onbekende activiteit, en PMA worden toegevoegd aan de behandelde buffycoatstalen waarna incubatie op 37°C plaatsvindt gedurende variabele tijdsduur. De β -galactosidase-enzymactiviteit van het serum en van de door PMA-geactiveerde cellen wordt achterhaald met behulp van de Victor X4 Multilabel Plate Reader. Een verdunningsreeks van de standaardserumpool A met gekende enzymactiviteit wordt mee ingezet bij elke enzymactiviteitmeting voor het opstellen van een ijkcurve met een correlatie tussen de gemeten fluorescente signalen en de enzymactiviteit van de standaardserumpool A. Het substraat 4-MUGal wordt toegevoegd aan alle microtiterwellen en het fluorescent signaal van het gevormde product 4-MU wordt gemeten bij 460 nm na 30 minuten incubatie op 37°C. Met behulp van de opgestelde standaardserumpool A-ijkcurve wordt de β -galactosidase-enzymactiviteit van de verschillende stalen bepaald, uitgaande van het gemeten fluorescent signaal.

Geïsoleerde en gezuiverde leukocyten (± 2 miljoen levende WBC) worden toegevoegd aan ofwel 100% serum afkomstig van de serumpool B (Bijlage C: β -galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 100% serum) ofwel 10% serum afkomstig van de serumpool B, bekomen door een 1-9 volumeverhouding van serum met verdunningsvloeistof (Bijlage D: β -galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 10% serum). De WBC in serum worden gestimuleerd door toevoeging van PMA met een eindconcentratie van 5 ng/ml. De serumstalen met geactiveerde leukocyten worden vervolgens verschillende tijden geïncubeerd op 37°C onder constante zachte menging. Na incubatie wordt het staal goed opgemengd waarna een vast volume van de geïncubeerde cellen met serum wordt afgenomen voor verdere enzymactiviteitmeting. Het overige staalvolume wordt gecentrifugeerd op 250 g gedurende 10 minuten voor het scheiden van de geactiveerde WBC en het geïncubeerde serum. Na centrifugatie wordt het bovenstaande supernatant, dat fungeert als celvrij serum na incubatie, overgebracht in een aparte proefbuis en worden de neergezakte leukocyten terug in suspensie gebracht door toevoeging van 500 μ l PBS voor de enzymactiviteitmeting van de membraangebonden β -galactosidase. Een vast volume van het celvrij serumstaal voor incubatie, na incubatie, de geïncubeerde cellen met serum en de terug in suspensie gebrachte leukocyten na incubatie wordt overgebracht in aparte microtiterwellen waarna éénzelfde volume van het substraat 4-MUGal wordt toegevoegd aan elke microtiterwell. Het aanwezige β -galactosidase in de verschillende stalen zorgt voor de enzymatische hydrolyse van het substraat 4-MUGal waardoor het fluorochroom 4-MU wordt afgesplitst. Na toevoeging van NaOH wordt de intensiteit van het fluorochroom gemeten met de Victor X4 bij een golflengte van 460 nm. De enzymactiviteit van de stalen wordt bepaald uitgaande van een ijkcurve, opgesteld door het fluorescent signaal van 4-MU te bepalen van een verdunningsreeks van de standaardserumpool (serumpool A) met gekende activiteit (3,61 a.u.).

4.2.3 Neuraminidase-enzymactiviteitmetingen

De transformatie van Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF wordt bekomen door een samenwerking van de enzymen β -galactosidase en neuraminidase. Vooraleer een besluit kan getrokken worden over het gebruik van geactiveerde leukocyten voor de vorming van GcMAF uitgaande van Gc1F- en Gc2-globuline, dient de verandering in enzymactiviteit naargelang de incubatietijd van beide enzymen te worden onderzocht.

De optimale reactieomstandigheden voor het bekomen van een ijkcurve om de neuraminidase-enzymactiviteit te bepalen uitgaande van gemeten fluorescentiesignalen, wordt onderzocht. Een verdunningsreeks van het standaardserumpool A wordt opgesteld in PBS waarna een eindvolume van 100 μ l wordt aangebracht met behulp van een natriumcitraatoplossing (50 mM) met pH 8. Een vast volume van het substraat MUNANA wordt toegevoegd aan een vast volume (verdund) standaardserumpool A. Het aanwezige neuraminidase in het serum zorgt voor de enzymatische hydrolyse van het substraat MUNANA waardoor het fluorochroom 4-MU wordt afgesplitst. Het gevormde product 4-MU wordt elke 3 minuten gedurende een totale reactietijd van 24 minuten op 37°C geëxciteerd bij een golflengte van 340 nm waarna het fluorescent signaal wordt gemeten bij 460 nm door de Victor X4 Multilabel Plate Reader. Het fluorescentieverschil van de verdunningen gemeten na een reactietijd van 12 minuten en 0 minuten bij verschillende toegevoegde hoeveelheden onverdund serum wordt bestudeerd voor het achterhalen van de optimale reactieomstandigheden voor het bekomen van de nodige ijkcurve.

5 Resultaten

5.1 β -galactosidase-enzymactiviteitmetingen

5.1.1 β -galactosidase-activiteitbepaling serumpool B

De β -galactosidase-enzymactiviteit van de samengestelde serumpool B wordt meermaals bepaald tijdens de enzymactiviteitbepalingsexperimenten van de geactiveerde leukocyten (Bijlage C: β -galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 100% serum). 100% serum of 10% serum wordt, zonder toevoeging van leukocyten en PMA, aangebracht in de microtiterwellen waarna er een vast volume 4-MUGal wordt toegevoegd. Het serum met bijgevoegd substraat wordt gedurende 30 minuten geïncubeerd op 37°C voor het bekomen van de enzymatische hydrolyse van 4-MUGal waarbij het fluorescerende product 4-MU wordt afgesplitst. Na 30 minuten incubatie wordt een vast volume NaOH-oplossing toegevoegd voor het bekomen van een basisch milieu (pH 8-9) waarna het vrijgekomen 4-MU wordt geëxciteerd bij 340 nm en het emissiesignaal wordt gemeten bij 460 nm met behulp van de Victor X4. Uitgaande van de gemeten emissies wordt de β -galactosidase-enzymactiviteit bepaald met behulp van een vooropgestelde ijkcurve van het serumpool A met een gekende activiteit.

De enzymactiviteiten worden weergegeven in arbitraire units (a.u.). Voor het vastleggen van de fluorescentiewaarde dat overeenkomt met 1 a.u. worden 100 enzymactiviteitmetingen uitgevoerd op het standaardserumpool A. De fluorescentiewaarde die gemeten wordt na 30 minuten reactietijd met het substraat 4-MUGal wordt gekoppeld aan een enzymactiviteit van 3,61 a.u. Uitgaande van een opgestelde ijkcurve van de standaardserumpool A wordt de gemiddelde β -galactosidase-enzymactiviteit van de serumpool B bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal bepaald, welke uitkomt op 3,10 a.u. (Tabel 8 in bijlage).

5.1.2 β -galactosidaseactiviteitbepaling van leukocyten na incubatie in 100% serumpool B

Om het effect van PMA op de expressie van β -galactosidase na te gaan, wordt de enzymactiviteit gemeten van zowel geactiveerde als niet-geactiveerde leukocyten na variërende incubatietijd met 100% serumpool B op 37°C (Bijlage C: β -galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 100% serum). Na variërende incubatietijden wordt een staal geïncubeerd van het serum met leukocyten, waarna de resterende suspensie voor 10 minuten wordt gecentrifugeerd op 250 g. Na centrifugatie wordt het supernatant, namelijk celvrij serum na incubatie, afgenomen. De β -galactosidase-enzymactiviteit van zowel het serumstaal met leukocyten als van het celvrij serumstaal wordt vervolgens bepaald in vergelijking met een standaardreeks van de serumpool A met gekende enzymactiviteit (Tabel 3).

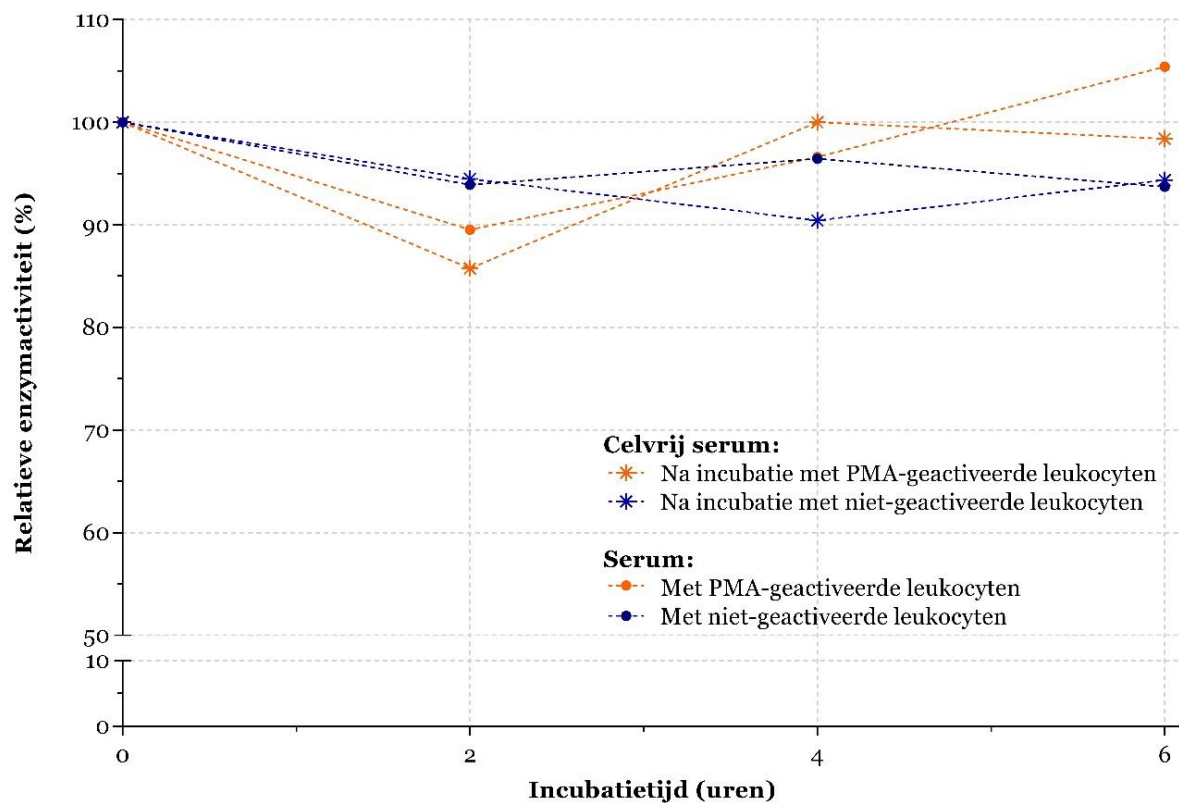
Tabel 3: β -galactosidase-enzymactiviteit bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C van celvrij serum en serum met niet-geactiveerde leukocyten of serum met PMA-geactiveerde leukocyten na variabele incubatietijd in 100% serum van serumpool B

| β-galactosidase-enzymactiviteit (a.u. \pm stdev) bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C na incubatie in 100% serum | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | <i>0 u incubatie zonder PMA op 37°C</i> | <i>2 u incubatie zonder PMA op 37°C</i> | <i>4 u incubatie zonder PMA op 37°C</i> | <i>6 u incubatie zonder PMA op 37°C</i> |
| <i>Celvrije serumpool voor incubatie</i> | 3,10 \pm 0,47 | | | |
| <i>Serum met leukocyten na incubatie</i> | 2,76 \pm 0,02 | 2,59 \pm 0,01 | 2,66 \pm 0,07 | 2,59 \pm 0,02 |
| <i>Celvrije serumpool na incubatie</i> | 2,84 \pm 0,01 | 2,69 \pm 0,02 | 2,57 \pm 0,04 | 2,68 \pm 0,01 |

| β-galactosidase-enzymactiviteit (a.u. \pm stdev) bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C na incubatie in 100% serum | | | | |
|---|--|--|--|--|
| | <i>0 u incubatie met PMA op 37°C</i> | <i>2 u incubatie met PMA op 37°C</i> | <i>4 u incubatie met PMA op 37°C</i> | <i>6 u incubatie met PMA op 37°C</i> |
| <i>Celvrije serumpool voor incubatie</i> | 3,10 \pm 0,47 | | | |
| <i>Serum met leukocyten na incubatie</i> | 2,96 \pm 0,01 | 2,65 \pm 0,08 | 2,86 \pm 0,02 | 3,12 \pm 0,00 |
| <i>Celvrije serumpool na incubatie</i> | 3,09 \pm 0,03 | 2,65 \pm 0,01 | 3,09 \pm 0,05 | 3,04 \pm 0,03 |

De resultaten, weergegeven in Tabel 3, worden bekomen door 10 μ l staaloplossing in 10 μ l citraatfosfaatbuffer (pH 4,4) aan te brengen in een microtiterplaat waarna het fluorescentiesignaal wordt gemeten bij 460 nm. De enzymactiviteit wordt bepaald uitgaande van het gemeten fluorescentiesignaal met behulp van een opgestelde ijkcurve, bestaande uit 20 μ l stockoplossing of verdunde oplossing van de standaardserumpool A. De weergegeven resultaten zijn afkomstig van één experiment waarbij alle oplossingen in duplo zijn gemeten.

Figuur 14 geeft vervolgens een grafische weergave van deze resultaten in procentuele stijging van de β -galactosidase-enzymactiviteit in celvrij serum en serum met al dan niet geactiveerde leukocyten na verschillende incubatietijden op 37°C.



Figuur 14: Relatieve β -galactosidase enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten met serum, niet geactiveerde leukocyten met serum en celvrij serum na variërende incubatietijden in 100% serumpool B op 37°C

De enzymactiviteit van het serum met PMA-geactiveerde cellen vertoont na 6 uur incubatie een sterkere procentuele stijging ten opzichte van de activiteit na 0 uur incubatie dan de niet-geactiveerde leukocyten (Figuur 14). Hieruit wordt geconcludeerd dat PMA een traag werkend stimulerend effect uitoefent op de enzymexpressie van β -galactosidase op het plasmamembraan van B-cellen. De resultaten van het experiment tonen tevens de aanwezigheid van β -galactosidase-enzymactiviteit in het celvrij serum na incubatie met PMA-geactiveerde en niet-geactiveerde leukocyten. Na 6 uur incubatie vertoont de relatieve enzymactiviteit van het celvrij serum na incubatie met PMA-geactiveerde leukocyten een hogere waarde dan het celvrij serum na incubatie met niet-geactiveerde leukocyten. De relatieve enzymactiviteit van het serum met PMA-geactiveerde leukocyten na 6 uur incubatie vertoont echter een hogere waarde dan de relatieve enzymactiviteit van het celvrij serum na 6 uur incubatie met PMA-geactiveerde leukocyten. Hieruit wordt geconcludeerd dat PMA vooral een stimulerend effect uitoefent op de expressie van membraangebonden β -galactosidase op B-cellen door inductie op DNA-niveau in de cel en in mindere mate op het vrije β -galactosidase aanwezig in het serum. De lichte stijging van vrije β -galactosidase-enzymactiviteit is deels te wijten aan fluctuaties binnen de metingen en deels aan de celdood van de aanwezige leukocyten, waardoor het β -galactosidase aanwezig in het celmembraan en het cytoplasma worden vrijgegeven in het serum.

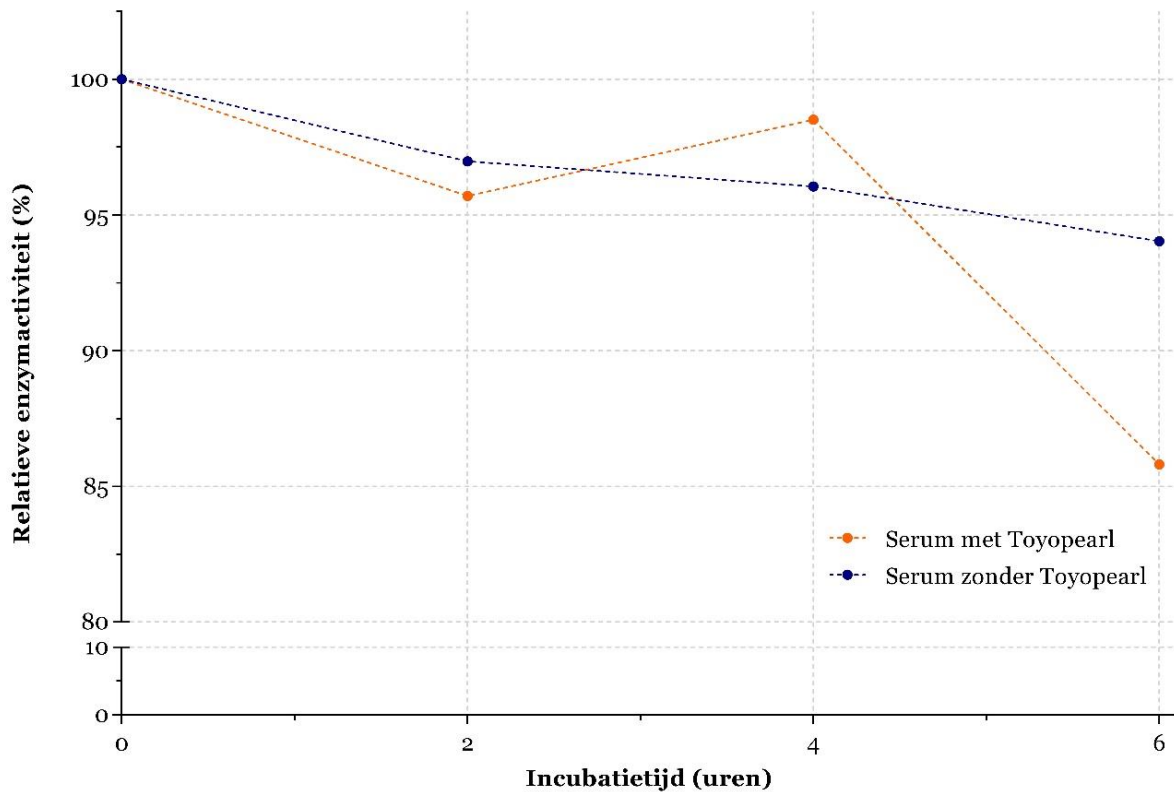
5.1.3 β -galactosidaseactiviteitbepaling van geïmmobiliseerde enzymen op de vaste drager Toyopearl bij incubatie in 100% serum

Epsilon Biotech maakt tot heden gebruik van externe deglycosylerende enzymen gekoppeld aan de vaste drager Toyopearl voor de enzymatische omvorming van aangekocht zuiver Gc-globuline naar GcMAF. Om een vergelijking mogelijk te maken tussen de enzymactiviteit van geïmmobiliseerde β -galactosidase op de Toyopearl en de activiteit van het membraangebonden enzym op geactiveerde B-cellen, worden 2 miljoen Toyopearl beads samengevoegd met 5 ml 100% serum afkomstig van de serumpool B. Na variërende incubatietijden op 37°C wordt de β -galactosidase-enzymactiviteit van zowel de vrije enzymen in het serum als van het serum met Toyopearl beads bepaald op analoge manier als beschreven in Bijlage C: β -galactosidaseactiviteitsmeting leukocyten bij incubatie in 100% serum (Tabel 4).

Tabel 4: β -galactosidase-enzymactiviteit bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C van serum, afkomstig van serumpool B, zonder Toyopearl en serum, afkomstig van serumpool B, met Toyopearl beads na variabele incubatietijd in 100% serum van serumpool B

| | β-galactosidase-enzymactiviteit (a.u. \pm stdev) bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C na incubatie met 100% serum | | | |
|--|--|---|---|---|
| | <i>0 u incubatie zonder PMA op 37°C</i> | <i>2 u incubatie zonder PMA op 37°C</i> | <i>4 u incubatie zonder PMA op 37°C</i> | <i>6 u incubatie zonder PMA op 37°C</i> |
| <i>Serum zonder Toyopearl voor incubatie</i> | 3,10 \pm 0,47 | | | |
| <i>Serum met Toyopearl na incubatie</i> | 3,41 \pm 0,05 | 3,26 \pm 0,06 | 3,36 \pm 0,00 | 2,92 \pm 0,01 |
| <i>Serum zonder Toyopearl na incubatie</i> | 3,40 \pm 0,02 | 3,30 \pm 0,03 | 3,27 \pm 0,05 | 3,20 \pm 0,02 |

Figuur 15 toont de procentuele verandering van de β -galactosidase-enzymactiviteit in 100% serum en serum met Toyopearl beads na verschillende incubatietijden op 37°C.



Figuur 15: Relatieve β -galactosidase enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie met en zonder Toyopearl na variërende incubatietijden in 100% serumpool B op 37°C

De licht dalende trend in enzymactiviteit van het serum zonder Toyopearl en het serum met Toyopearl na stijgende duur van incubatie zijn wellicht te wijten aan fluctuaties binnen de metingen (Tabel 4 en Figuur 15). De partikelgrootte van de Toyopearl beads bedraagt 65 μm wat leidt tot het snel neerzakken van de beads in het serumstaal [72]. Dit resulteert in een spreiding van de gepipetteerde hoeveelheid beads die afgezonderd wordt in de microtiterplaat voor de enzymactiviteitsbepaling met de Victor X4. Uitgaande van de bekomen resultaten van het experiment wordt geconcludeerd dat geen inductie van β -galactosidase-enzymexpressie optreedt van zowel vrije enzymen in het serum als van de enzymen geïmmobiliseerd op de Toyopearl beads bij incubatie op 37°C.

Serum met PMA-geactiveerde leukocyten na 6u incubatie op 37°C in serum van serumpool B vertoont een β -galactosidase-enzymactiviteit van 3,04 a.u. (Tabel 3) terwijl serum met Toyopearl na 6u incubatie op 37°C in serumpool B een β -galactosidase-enzymactiviteit van 2,92 a.u. bedraagt (Tabel 4). Uitgaande van deze resultaten wordt er geconcludeerd dat bij gebruik van PMA-geactiveerde leukocyten na 6 uur incubatie in serum ongeveer dezelfde β -galactosidase-enzymactiviteit verkregen wordt als bij gebruik van serum met geïmmobiliseerde enzymen op de vaste dragers Toyopearl.

5.1.4 β -galactosidaseactiviteitbepaling van geactiveerde leukocyten met incubatie in 10% serum

Bij het bestuderen van de microscopische beelden van de geïsoleerde PMA-geactiveerde leukocyten, werd waargenomen dat reeds na 2 uur incubatie een daling optreedt van het aantal levende witte bloedcellen. Het lage overlevingspercentage van de witte bloedcellen kan mogelijk te wijten zijn aan de hoge viscositeit van het serum (1,10 – 1,30 mPa.s) waardoor de leukocyten een grote wrijving ondervinden bij centrifugatie [73]. Om na te gaan of de leukocyten een verhoogd overlevingspercentage vertonen bij gebruik van verdund serum, wordt een vergelijking opgesteld tussen de veranderende plasmamembraangebonden β -galactosidase-enzymactiviteit op PMA-geactiveerde B-cellen na variërende incubatietijden met 100% serum, 10% serum in PBS en 10% serum in groeimedium.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat PMA een traag stimulerend effect uitoefent op de enzymexpressie van membraangebonden β -galactosidase op B-cellen (Figuur 14) waardoor er slechts een zeer lage enzymactiviteit aanwezig is bij de eerste 4 uur incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten. Door de lage enzymactiviteit van het membraangebonden β -galactosidase zal gedurende de eerste incubatie-uren slechts een zeer lage fluorescentie gemeten worden. Voor het verhogen van de fluorescentiesignalen worden er aanpassingen doorgevoerd aan het oorspronkelijk protocol (Bijlage C: β -galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 100% serum). Het volume aan terug in suspensie gebrachte PMA-geactiveerde leukocyten na incubatie dat toegevoegd wordt aan de microtiterwellen voor de enzymactiviteitmeting wordt verhoogd van 20 μ l naar 100 μ l.

Voor het bekomen van éénzelfde totaalvolume in alle microtiterwellen, wordt het eindvolume van de standaardserumpool A aanwezig in de wellen tevens verhoogd tot 100 μ l. Voor het bekomen van voldoende lage fluorescentiesignalen bij de standaard verdunningsreeks, wordt in elke microtitercup 20 μ l (verdund) standaardserumpool A aangebracht met toevoeging van 80 μ l citraatfosfaatbuffer (pH 4,4). 80 μ l 4-MUGal substraatoplossing (0,02 mg/ml) wordt toegevoegd aan alle microtiterwellen waarna het fluorescentiesignaal wordt gemeten na 30 minuten incubatie op 37°C bij 460 nm na excitatie door licht met een golflengte van 340 nm.

Tabel 5 toont een overzicht van de gemeten β -galactosidase-enzymactiviteit bij gebruik van 20 μ l standaardserumpool A met toevoeging van 80 μ l substraatoplossing (0,02 mg/ml) (Protocol C) en de gemeten enzymactiviteiten bij gebruik van 20 μ l standaardserumpool met toevoeging van 80 μ l citraatfosfaatbuffer met pH 4,4 en 80 μ l substraatoplossing (0,02 mg/ml) (Protocol D). Voor het opstellen van de ijkcurves worden de fluorescenties van elke verdunning tweemaal gemeten en wordt een regressiecurve geconstrueerd via een vijfparametervergelijking (Figuur 16). De ijkcurves vertonen een R^2 van respectievelijk 0,9789 en 0,9976. Tabel 5 toont de gemiddelde emissiesignalen gemeten na 30 minuten incubatietijd op 37°C, startende vanaf het moment dat het substraat 4-MUGal wordt toegevoegd aan de microtiterwellen, bij 460 nm. Via de vijfparametervergelijking wordt de enzymactiviteit van elke verdunning van de standaardserumpool A berekend, welke weergegeven zijn als de berekende enzymactiviteiten. Door het vergelijken van de berekende enzymactiviteit en de theoretische enzymactiviteit, waarbij de onverdunde standaardserumpool A over een enzymactiviteit van 3,61 a.u. beschikt, kan de procentuele afwijking tussen de waarden achterhaald worden.

De afwijking tussen de berekende enzymactiviteiten en de theoretische enzymactiviteiten vertonen lagere waarden bij een hogere verdunning van de standaardserumpool A bij gebruik van protocol D (Tabel 5). De ijkcurve opgesteld met protocol D is bijgevolg betrouwbaarder bij lagere fluorescentiesignalen dan de ijkcurve opgesteld met protocol C. Omwille van deze observatie wordt er besloten om de enzymactiviteit van de terug in suspensie gebrachte PMA-geactiveerde leukocyten, door het toevoegen van 500 μ l PBS, te bepalen met behulp van Bijlage D: β -galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 10% serum.

Tabel 5: De gemiddelde emissiesignalen, de berekende enzymactiviteiten uitgaande van de vijfparametervergelijking en de theoretische β -galactosidase-enzymactiviteit van de verdunningsreeks van standaardserumpool A bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C bekomen met het gebruik van Protocol C en Protocol D

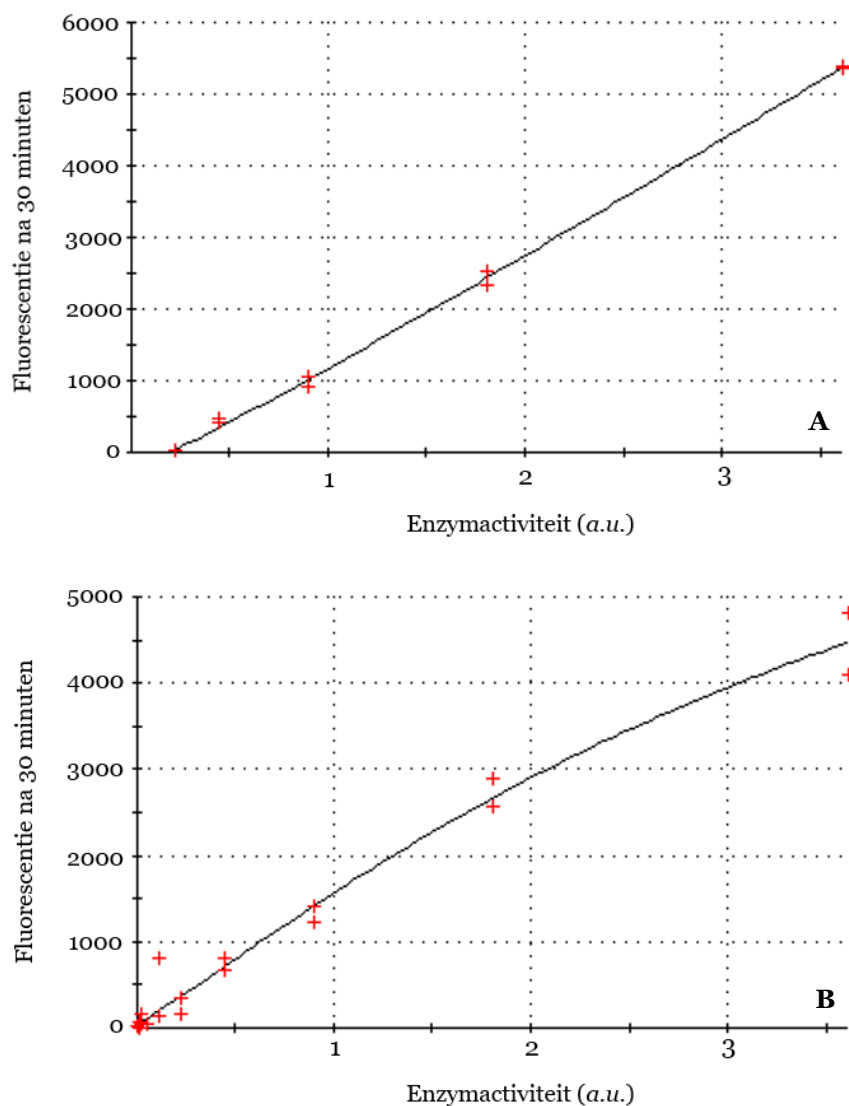
β -galactosidase-enzymactiviteit (a.u. \pm stdev) bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C uitgevoerd met 20 μ l standaardserumpool A (Protocol C)

| | Gemiddelde fluorescentie-sigitaal | Berekende enzymactiviteit (a.u. \pm stdev) | Theoretische enzymactiviteit (a.u.) | Afwijking (%) |
|------------------|-----------------------------------|--|-------------------------------------|---------------|
| Geen verdunning | 62990 | 3,61 \pm 0,30 | 3,61 | 0 |
| Verdunning 1/2 | 45823 | 1,87 \pm 0,10 | 1,81 | 3 |
| Verdunning 1/4 | 31625 | 0,84 \pm 0,04 | 0,90 | 7 |
| Verdunning 1/8 | 25915 | 0,47 \pm 0,02 | 0,45 | 5 |
| Verdunning 1/16 | 21035 | 0,15 \pm 0,01 | 0,23 | 32 |
| Verdunning 1/32 | 23161 | 0,29 \pm 0,06 | 0,11 | 157 |
| Verdunning 1/64 | 18623 | Nb | 0,06 | Nb |
| Verdunning 1/128 | 19405 | 0,08 \pm 0,00 | 0,03 | 187 |
| Verdunning 1/256 | 18841 | 0,02 \pm 0,00 | 0,01 | 36 |
| Verdunning 1/512 | 18376 | Nb | 0,01 | Nb |

β -galactosidase-enzymactiviteit (a.u. \pm stdev) bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C uitgevoerd met 20 μ l standaardserumpool A en 80 μ l citraatfosfaatbuffer (Protocol D)

| | Gemiddelde fluorescentie-sigitaal | Berekende enzymactiviteit (a.u. \pm stdev) | Theoretische enzymactiviteit (a.u.) | Afwijking (%) |
|------------------|-----------------------------------|--|-------------------------------------|---------------|
| Geen verdunning | 73459 | 3,61 \pm 0,09 | 3,61 | 0 |
| Verdunning 1/2 | 43968 | 1,80 \pm 0,06 | 1,81 | 0 |
| Verdunning 1/4 | 29592 | 0,88 \pm 0,03 | 0,90 | 2 |
| Verdunning 1/8 | 24151 | 0,52 \pm 0,01 | 0,45 | 15 |
| Verdunning 1/16 | 19194 | 0,17 \pm 0,01 | 0,23 | 26 |
| Verdunning 1/32 | 18528 | 0,12 \pm 0,00 | 0,11 | 4 |
| Verdunning 1/64 | 17309 | 0,05 \pm 0,00 | 0,06 | 19 |
| Verdunning 1/128 | 17102 | 0,02 \pm 0,00 | 0,03 | 44 |
| Verdunning 1/256 | 17223 | 0,01 \pm 0,00 | 0,01 | 28 |
| Verdunning 1/512 | 17999 | 0,18 \pm 0,02 | 0,01 | 2462 |

Legende: Niet bepaald (Nb)



Figuur 16: Ijckurve van standaardserumpool A bij gebruik van Protocol C (A) en Protocol D (B)

Na het bekomen van de nodige volumes voor het construeren van de ijckurve, dient er gezocht te worden naar de optimale condities voor een maximale overlevingstijd van de leukocyten tijdens de incubatieperiode met serumpool B. Doordat het effect van PMA op de enzymexpressie van β -galactosidase enkel waarneembaar is bij levende leukocyten, wordt de verandering in enzymactiviteit van het membraangebonden β -galactosidase van PMA-geactiveerde leukocyten gemeten bij incubatie van de cellen met 100% serum, 10% serum in PBS en 10% serum in groeimedium KMEM/F-12. Er worden vier parallele experimenten uitgevoerd waarbij telkens 2 miljoen WBC worden geactiveerd met PMA en toegevoegd aan 100% serum, 10% serum in PBS of 10% serum in groeimedium tot een totaalvolume van 5 ml. Voor de experimenten van incubatie in 100% serum worden 2 soorten testen uitgevoerd, gebruik makende van 2 miljoen cellen van éénzelfde persoon en 2 miljoen cellen van meerdere personen die op voorhand worden samengevoegd in een pool. Alle stalen worden vervolgens gedurende 6 uur geïncubeerd op 37°C waarbij elk uur de enzymactiviteit van de membraangebonden β -galactosidase op de WBC wordt gemeten.

Hierbij worden de stalen gedurende 10 minuten gecentrifugeerd op 250 g waarna het bovenstaande serum wordt verwijderd. De neergeslagen leukocytenpellet wordt terug in suspensie gebracht door het toevoegen van 500 µl PBS (pH 7) waarna de enzymactiviteit wordt bepaald zoals beschreven in Bijlage D: β-galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 10% serum.

Tabel 6 toont de gemeten enzymactiviteiten van de leukocyten na variabele incubatietijden in 100% serum en 10% serum met PBS of groeimedium. Voor het verkrijgen van een beeld op de enzymactiviteitsverandering bij blootstelling aan serum met pH 7, wordt de enzymactiviteit van het membraangebonden β-galactosidase gemeten in neutrale pH bekomen door het terug in suspensie brengen van de neergeslagen leukocytenpellet met behulp van PBS met pH 7. De resultaten zijn bekomen door fluorescentiemetingen bij 460 nm van 100 µl staaloplossing waarna de enzymactiviteit wordt bepaald met gebruik van een ijkcurve, bekomen door het fluorescentiesignaal van 80 µl citraatfosfaatbuffer met 20 µl stock- of verdunde oplossing te meten en te koppelen aan de bijhorende gekende enzymactiviteit. Het experiment is eenmaal uitgevoerd waarbij alle stalen en standaardreksoplossingen in duplo zijn gemeten.

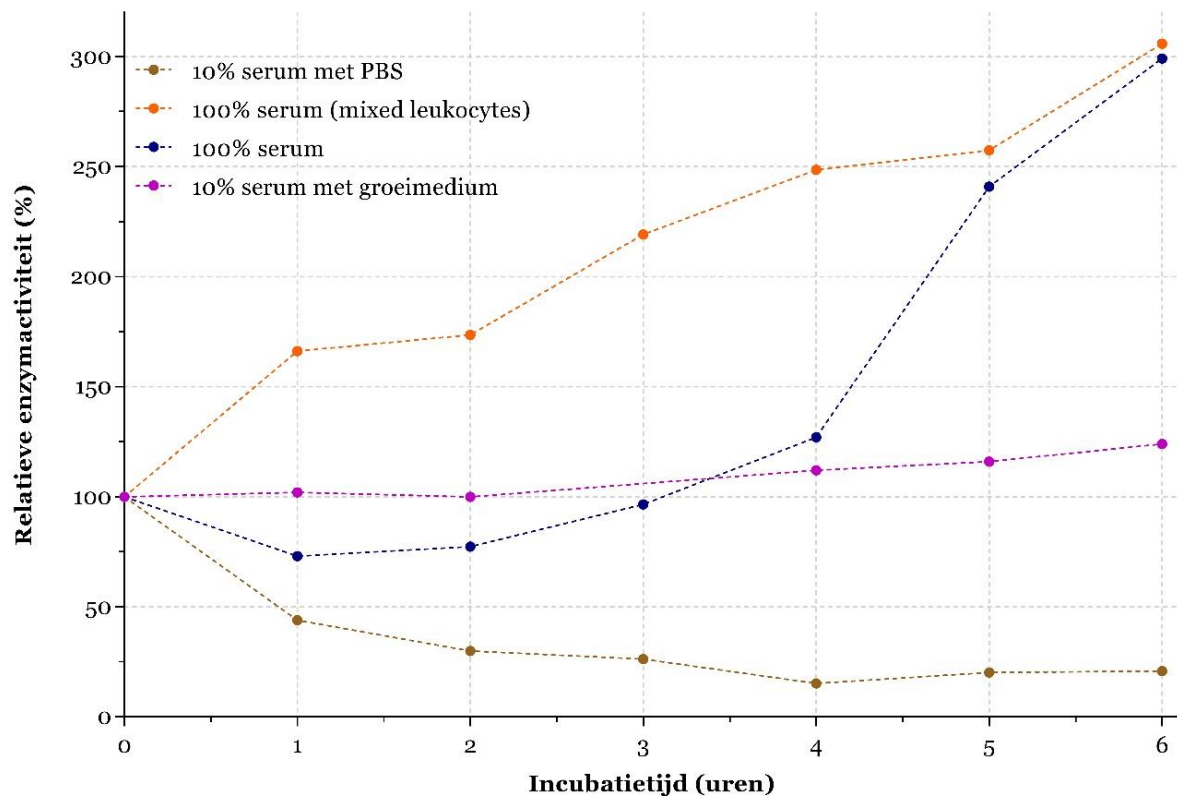
Tabel 6: Membraangebonden β-galactosidase-enzymactiviteit op PMA-geactiveerde leukocyten bij pH 7 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C na variabele incubatietijd in 100% serumpool B, 10% serumpool B met PBS en 10% serumpool B met groeimedium KMEM/F-12

Memraangebonden β-galactosidase-enzymactiviteit (a.u. ± stdev) op PMA-geactiveerde leukocyten bij pH 7 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C na incubatie

| | <i>0 u incubatie op 37°C</i> | <i>1 u incubatie op 37°C</i> | <i>2 u incubatie op 37°C</i> | <i>3 u incubatie op 37°C</i> |
|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Incubatie in 100% serum</i> | 1,15 ± 0,00 | 0,84 ± 0,13 | 0,89 ± 0,04 | 1,11 ± 0,02 |
| <i>Incubatie in 10% serum met PBS</i> | 1,64 ± 0,03 | 0,72 ± 0,09 | 0,49 ± 0,00 | 0,43 ± 0,01 |
| <i>Incubatie in 10% serum met groeimedium</i> | 0,50 ± 0,01 | 0,51 ± 0,01 | 0,50 ± 0,01 | Nb |
| <i>Incubatie mixed leukocytes in 100% serum</i> | 0,68 ± 0,02 | 1,13 ± 0,01 | 1,18 ± 0,04 | 1,49 ± 0,07 |
| | <i>4 u incubatie op 37°C</i> | <i>5 u incubatie op 37°C</i> | <i>6u incubatie op 37°C</i> | |
| <i>Incubatie in 100% serum</i> | 1,46 ± 0,01 | 2,77 ± 0,11 | 3,44 ± 0,11 | |
| <i>Incubatie in 10% serum met PBS</i> | 0,25 ± 0,01 | 0,33 ± 0,02 | 0,34 ± 0,03 | |
| <i>Incubatie in 10% serum met groeimedium</i> | 0,56 ± 0,01 | 0,58 ± 0,01 | 0,62 ± 0,03 | |
| <i>Incubatie mixed leukocytes in 100% serum</i> | 1,69 ± 0,02 | 1,75 ± 0,01 | 2,08 ± 0,11 | |

Legende: Niet bepaald (Nb)

Figuur 17 verschaft een overzicht van de procentuele verandering van membraangebonden β -galactosidase-enzymactiviteit op PMA-geactiveerde leukocyten na variërende incubatietijden in verschillende serummedia ten opzichte van 0 uur incubatie.



Figuur 17: Relatieve membraangebonden β -galactosidase-enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten na variërende incubatietijden op 37°C in 100% serum, 10% serum met PBS en 10% serum met groeimedium KMEM/F-12

Incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten in 10% serum met PBS vertoont reeds na 1 uur incubatie een halvering in enzymactiviteit ten opzichte van de enzymactiviteit voor incubatie (Figuur 17). Na 6 uur incubatie is de β -galactosidase-enzymactiviteit nog slechts 20% in vergelijking met de enzymactiviteit na 0 uur incubatie. Uitgaande van deze resultaten wordt geconcludeerd dat PMA-geactiveerde leukocyten een laag overlevingspercentage vertonen bij incubatie in 10% serum met PBS door gebrek aan de nodige voedings- en groeistoffen noodzakelijk voor leukocytoproliferatie.

De geactiveerde leukocyten bij incubatie in 10% serum met groeimedium vertonen na 6 uur incubatie een lichte enzymactiviteitstijging van 124% in vergelijking met de activiteit na 0 uur incubatie (Figuur 17). Door het gebruik van groeimedium worden er extra voedingsstoffen toegevoegd wat leidt tot een grotere overleving van de leukocyten in vergelijking met incubatie met 10% serum in PBS. De totale hoeveelheid voedings- en groeistoffen in het verdunde serum met groeimedium is echter nog verlaagd in vergelijking met onverdund serum waardoor de proliferatie van de geactiveerde leukocyten slechts in beperkte mate kan optreden.

De grootste enzymactiviteitverandering na 6 uur incubatie wordt waargenomen bij lymfocytincubatie in 100% serum, zowel bij de stalen afkomstig van éénzelfde persoon als de stalen afkomstig van samengevoegde witte bloedcellen van verschillende personen (Figuur 17). Bij incubatie van de mixed leukocytes wordt reeds een enzymactiviteitstijging van 160%, ten opzichte van 0 uur incubatie, waargenomen na het eerste incubatie uur. Door het samenvoegen van leukocyten afkomstig van meerdere personen wordt een mixed leukocytes reactie opgewekt, wat zorgt voor de snelle activatie en proliferatie van de leukocyten [74], [75]. De enzymactiviteit van de leukocyten afkomstig van éénzelfde persoon vertoont gedurende het eerste uur van incubatie in 100% serum een daling. Dit is wellicht te wijten aan de hoge viscositeit van het serum waardoor de migratie van PMA doorheen het serumstaal wordt vertraagd. Na 6 uur incubatie van de lymfocyten afkomstig van éénzelfde persoon en van de mixed leukocytes, wordt er een enzymactiviteitstijging waargenomen van 300% ten opzichte van de start enzymactiviteit (0 uur incubatie). Uitgaande van deze resultaten wordt geconcludeerd dat de grootste activatie en proliferatie van de leukocyten wordt opgewekt bij het gebruik van PMA-geactiveerde leukocyten geïncubeerd in 100% serum.

5.2 Neuraminidase-enzymactiviteitmeting

Voor het bestuderen van de verandering in plasmamembraangebonden neuraminidase-enzymactiviteit op PMA-geactiveerde T-cellen bij variërende incubatieperiode met serum, is er nood aan het opstellen van een ijkcurve voor het bepalen van onbekende enzymactiviteiten uitgaande van de gemeten fluorescentiesignalen. Verschillende ijkcurven worden opgesteld bij variërende reactiecondities voor het achterhalen van de optimale omstandigheden.

Voor het bekomen van een ijkcurve voor de neuraminidase-enzymactiviteitmetingen, wordt gebruik gemaakt van dezelfde standaardserumpool A als bij het opstellen van de ijkcurve van de β -galactosidase-enzymactiviteitmetingen. Een verdunningsreeks van de standaardserumpool A wordt geconstrueerd door verdunning in PBS waarna een natriumcitraatoplossing (pH 8) met variërende molariteit aan de microtiterwellen wordt toegevoegd tot een volume van 100 μ l. 80 μ l substraat MUNANA wordt toegevoegd aan alle microtiterwellen waarna de fluorescentie om de 3 minuten gemeten wordt bij 460 nm gedurende 24 minuten. Het gemeten fluorescentieverschil tussen 12 minuten en 0 minuten wordt uitgezet ten opzichte van de hoeveelheid toegevoegd onverdund serumpool A in de microtiterwellen (Bijlage E: testen van reactieomstandigheden voor het opstellen van de ijkcurve voor neuraminidase-enzymactiviteitbepaling). Tabel 7 vertoont een overzicht van het gemeten fluorescentieverschil tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij verschillende hoeveelheden onverdund serumpool A aangelengd met PBS tot 20 μ l of 50 μ l waarna respectievelijk 80 μ l of 50 μ l natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μ l MUNANA-substraat wordt toegevoegd. Voor het construeren van de ijkcurve worden de verschillende hoeveelheden onverdund serumpool A aanwezig in 180 μ l eindvolume op de x-as uitgezet met de bijhorende fluorescentieveranderingen tussen de meting na 12 minuten en 0 minuten uitgezet op de y-as.

Tabel 7: Gemeten en berekend fluorescentieverschil tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij verschillende hoeveelheden onverdund serumpool A aangelengd met PBS tot 20 µl of 50 µl met toevoegen van 80 µl of 50 µl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 µl MUNANA-substraat.

Fluorescentieverschil tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij variërende hoeveelheden onverdund serumpool A aangelengd met PBS tot 20 µl, toevoegen van 80 µl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 µl MUNANA-substraat

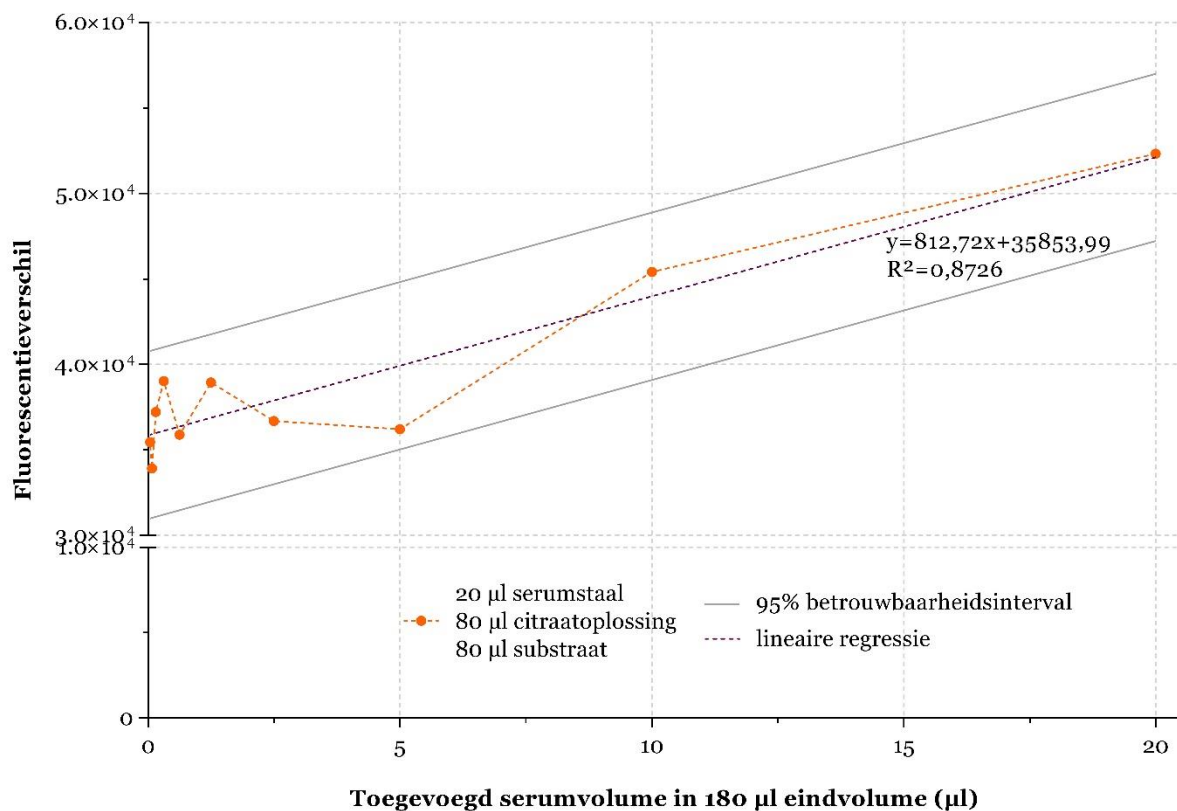
| <i>Toegevoegd volume onverdund serumpool A (µl)</i> | <i>Gemeten fluorescentieverschil</i> | <i>Berekend fluorescentieverschil uitgaande van regressievergelijking</i> | <i>Ondergrens 95% BI</i> | <i>Bovengrens 95% BI</i> |
|---|--------------------------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| 20,0 | 52316 | 52108 | 47213 | 57003 |
| 10,0 | 45402 | 43981 | 39086 | 48876 |
| 5,00 | 36205 | 39918 | 35023 | 44817 |
| 2,50 | 36680 | 37886 | 32991 | 42781 |
| 1,25 | 38943 | 36870 | 31975 | 41765 |
| 0,625 | 35879 | 36362 | 31467 | 41257 |
| 0,313 | 39022 | 36108 | 31213 | 41003 |
| 0,156 | 37207 | 35981 | 31086 | 40876 |
| 0,0781 | 33908 | 35917 | 31022 | 40812 |
| 0,0391 | 35455 | 35886 | 30991 | 40781 |

Fluorescentieverschil tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij variërende hoeveelheden onverdund serumpool A aangelengd met PBS tot 50 µl, toevoegen van 50 µl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 µl MUNANA-substraat

| <i>Toegevoegd volume onverdund serumpool A (µl)</i> | <i>Gemeten fluorescentieverschil</i> | <i>Berekend fluorescentieverschil uitgaande van regressievergelijking</i> | <i>Ondergrens 95% BI</i> | <i>Bovengrens 95% BI</i> |
|---|--------------------------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| 50,0 | 109456 | 110611 | 104676 | 116546 |
| 25,0 | 74110 | 69865 | 63930 | 75800 |
| 12,5 | 47290 | 49492 | 43557 | 55427 |
| 6,25 | 34981 | 39305 | 33370 | 45240 |
| 3,13 | 34618 | 34212 | 28277 | 40147 |
| 1,56 | 34186 | 31665 | 25730 | 37600 |
| 0,781 | 31328 | 30392 | 24457 | 36327 |
| 0,391 | 30683 | 29755 | 23820 | 35690 |
| 0,195 | 29436 | 29437 | 23502 | 35372 |
| 0,0976 | 27924 | 29278 | 23343 | 35213 |

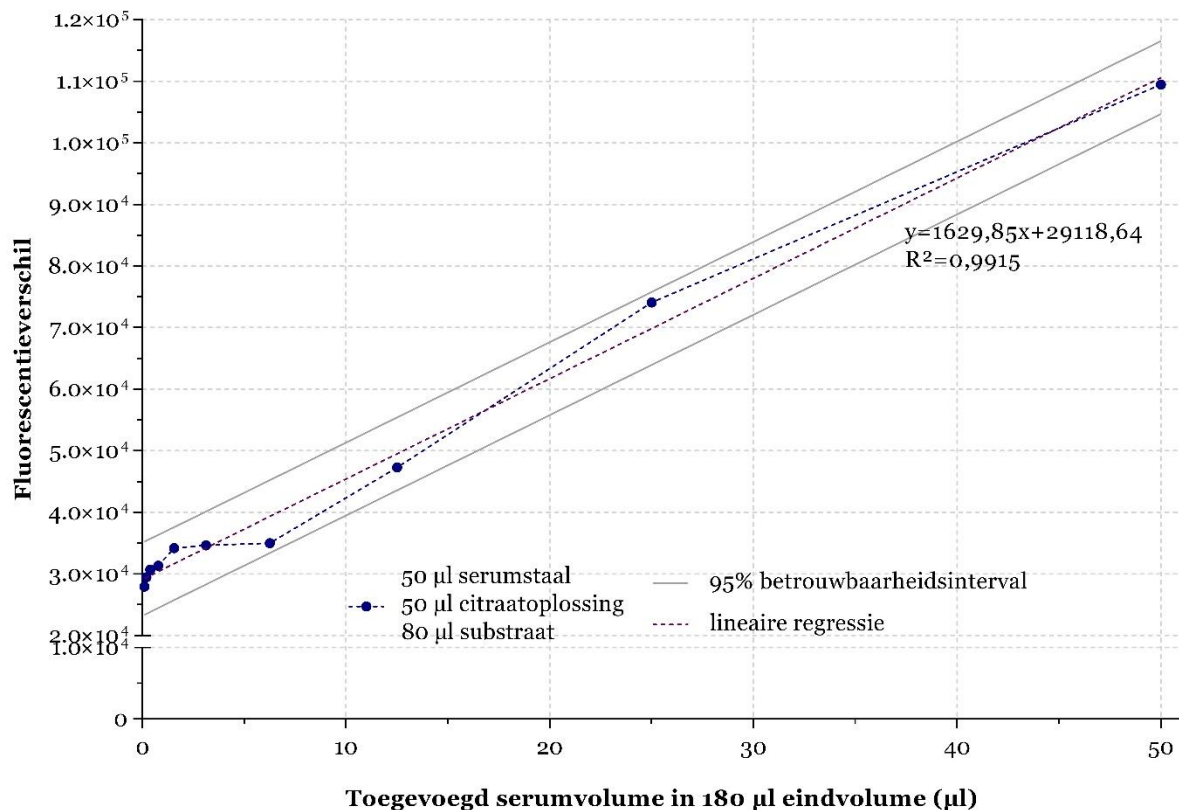
Legende: betrouwbaarheidsinterval (BI)

Figuur 18 toont het fluorescentieverschil tussen de meting na 12 minuten en 0 minuten van verschillende hoeveelheden toegevoegd onverdunde standaardserumpool A aangelengd met PBS tot 20 μl , toevoegen van 80 μl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μl MUNANA-substraat. Uitgaande van de lineaire regressiecurve wordt het berekende fluorescentieverschil en de grenzen van het 95% betrouwbaarheidsinterval bepaald (Tabel 7). Alle bekomen meetwaarden liggen binnen het betrouwbaarheidsinterval waardoor geen metingen verwaarloosd worden bij het opstellen van de lineaire regressiecurve. De regressiecurve beschikt over een R^2 -waarde van 0,8726 waardoor er geen eenduidig lineair verband wordt waargenomen tussen de fluorescentieverandering en de hoeveelheid toegevoegd onverdund serum. Uitgaande van deze resultaten wordt geconcludeerd dat het uitzetten van de gemeten fluorescentieverschillen tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd ten opzichte van verschillende hoeveelheden toegevoegd onverdunde standaardserumpool A aangelengd met PBS tot 20 μl , toevoegen van 80 μl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μl MUNANA-substraat geen goede methode is voor het construeren van een ijkcurve.



Figuur 18: Fluorescentieverschil, lineaire regressie en grenzen van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de gemeten fluorescentieverschillen tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij variërende hoeveelheden onverdund serumpool A aangelengd met PBS tot 20 μl , toevoegen van 80 μl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μl MUNANA-substraat

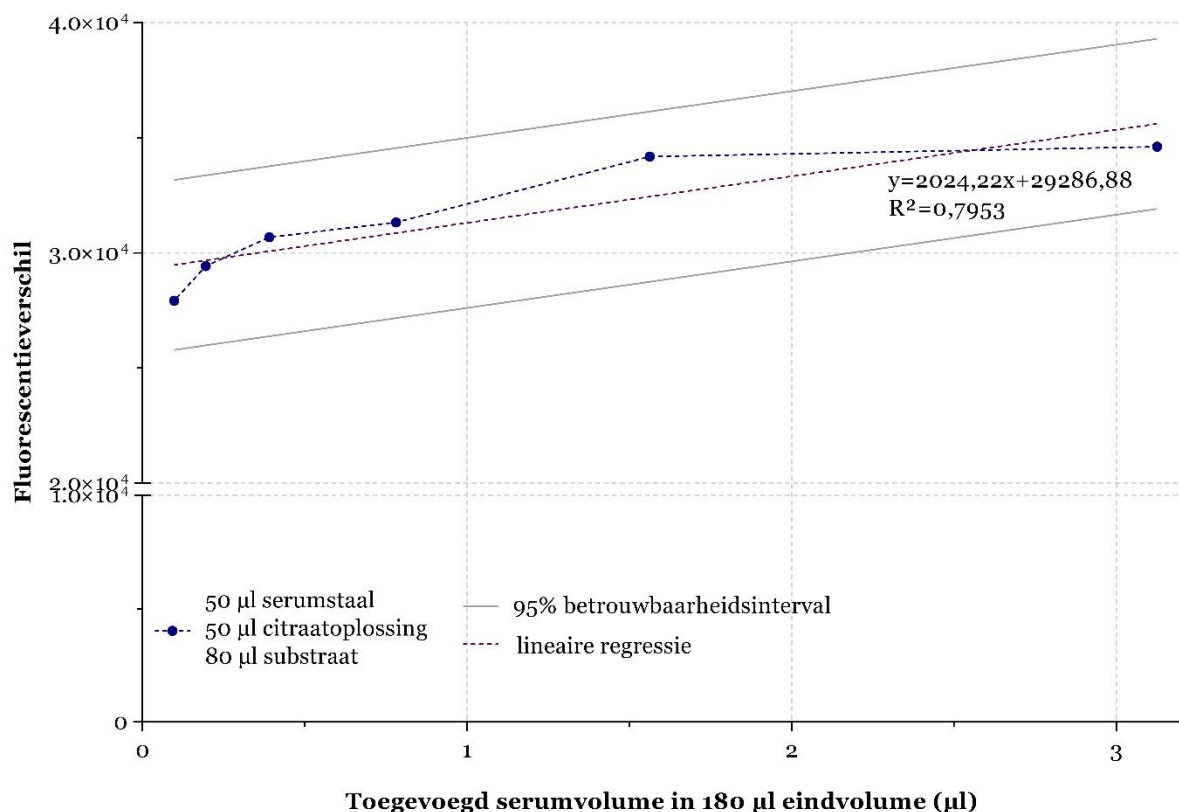
Voor het verkrijgen van een beter lineair verband tussen de fluorescentieverandering en de hoeveelheid toegevoegd serum, wordt een groter serumvolume toegevoegd in de microtiterwells met behoud van eindvolume. Figuur 19 toont het fluorescentieverschil tussen de meting na 12 minuten en 0 minuten van verschillende hoeveelheden toegevoegd onverdunde standaardserumpool A aangelengd met PBS tot 50 μl , toevoegen van 50 μl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μl MUNANA-substraat. Alle meetwaarden zijn gelegen binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval waardoor een lineaire regressiecurve met een R^2 -waarde van 0,9915 wordt bekomen na regressie door alle meetpunten (Tabel 7 en Figuur 19).



Figuur 19: Fluorescentieverschil, lineaire regressie en grenzen van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de gemeten fluorescentieverschillen tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij variërende hoeveelheden onverdunde serumpool A aangelengd met PBS tot 50 μl , toevoegen van 50 μl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μl MUNANA-substraat

Uitgaande van de eerder bekomen resultaten van de β -galactosidase-enzymactiviteitbepaling van PMA-geactiveerde leukocyten (Tabel 6), wordt een lage membraangebonden neuraminidase-enzymactiviteit verwacht bij PMA-geactiveerde leukocyten gedurende de eerste uren van incubatie met serum. Om na te gaan of de bekomen ijkcurve bruikbaar is voor het meten van neuraminidase-enzymactiviteiten die beduidend lager zijn dan de enzymactiviteit van het vrije neuraminidase aanwezig in de standaardserumpool A, wordt een lineaire regressie toegepast op de bekomen fluorescentieverschillen bij gebruik van lage hoeveelheden toegevoegd onverdunde standaardserumpool A.

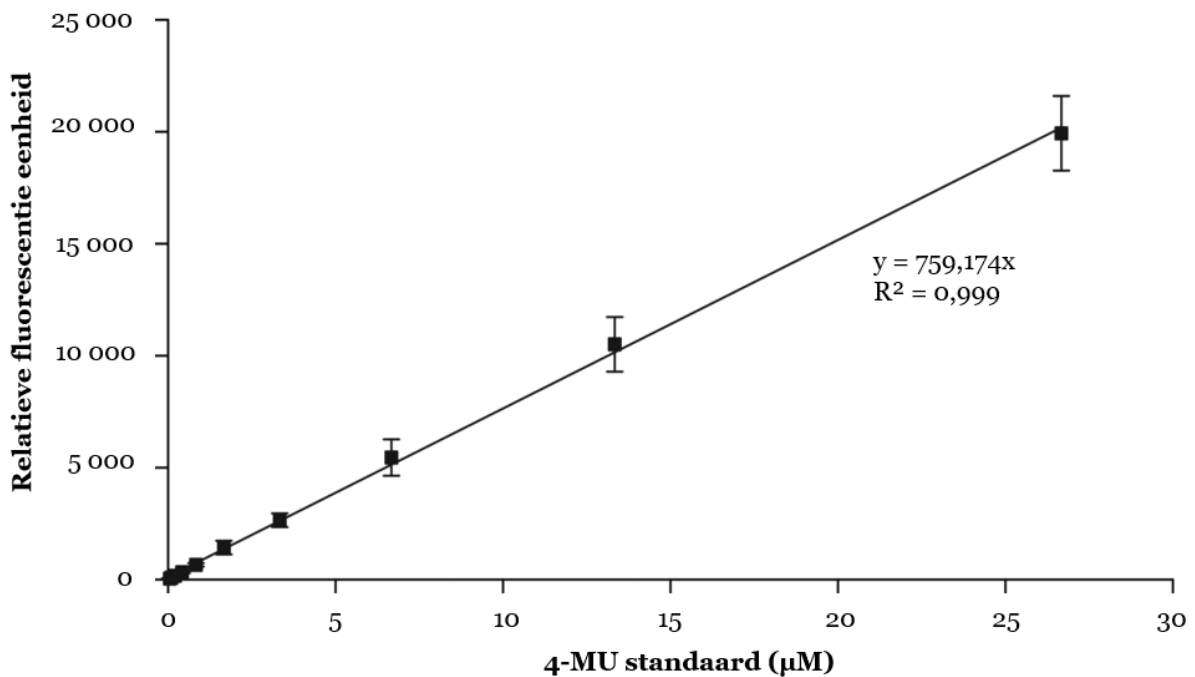
Figuur 20 toont het fluorescentieverschil tussen de meting na 12 minuten en 0 minuten van verschillende lage hoeveelheden toegevoegd onverdunde standaardserumpool A, gaande van 0,0976 μl tot en met 3,13 μl weergegeven in Tabel 7, aangelengd met PBS tot 50 μl en met het toevoegen van 50 μl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μl MUNANA-substraat. De bekomen lineaire regressiecurve bij gebruik van lage hoeveelheden serum vertoont een R^2 -waarde van 0,7953. Het lineair verband tussen de gemeten fluorescentiesignalen en de toegevoegde hoeveelheid serum ligt beduidend lager bij enkel gebruik van lage serumvolumes (Figuur 20) in vergelijking met het gebruik van zowel hoge als lage serumvolumes (Figuur 19). Het gebruik van grote hoeveelheden onverdund serumpool A resulteert in een lineaire stijging van het fluorescentieverschil bij een toegevoegd serumvolume van 6,25 μl tot 50 μl . Bij gebruik van toegevoegde hoeveelheden onverdund serumpool A kleiner dan 6,25 μl treedt er een daling op in het lineair verband (Figuur 19 en Figuur 20). De bekomen meetpunten bij een toegevoegd serumvolume van 6,25 μl tot 50 μl zijn verder uit elkaar gelegen dan de bekomen meetpunten bij een toegevoegde hoeveelheden onverdund serumpool A kleiner dan 6,25 μl . De meetpunten bekomen bij hoge hoeveelheden serumstaal vertonen een grotere invloed op de ligging van de lineaire regressiecurve en de R^2 -waarde waardoor een lineair verband wordt waargenomen bij het analyseren van zowel hoge als lage serumvolumes maar niet bij het analyseren van de meetpunten bekomen bij het gebruik van enkel lage serumvolumes [76].



Figuur 20: Fluorescentieverschil, lineaire regressie en grenzen van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de gemeten fluorescentieverschillen tussen 12 minuten en 0 minuten reactietijd bij variërende lage hoeveelheden onverdund serumpool A (gaande van 0,0976 μl tot en met 3,13 μl) aangelengd met PBS tot 50 μl , toevoegen van 50 μl natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) en 80 μl MUNANA-substraat

Ongeacht de verandering in serumstaalvolume blijft het construeren van een betrouwbare regressiecurve door alle meetpunten niet mogelijk door de niet-systematische fluorescentieverandering bij kleinere toegevoegde serumvolumes (Figuur 20). Natriumcitraat vormt mogelijks een complex met het vrije calcium aanwezig in het standaardserumpool A, wat resulteert in een daling van de vrije Ca^{2+} -concentratie [77]. Neuraminidase is een calciumafhankelijk enzym waarbij vrij Ca^{2+} een belangrijke rol speelt in de werking en stabiliteit van het enzym [78]. Bij hoge hoeveelheden toegevoegd serumvolume is de vrije Ca^{2+} -concentratie hoog genoeg voor het verschaffen van een goede enzymatische werking van het neuraminidase door de grote hoeveelheid vrij Ca^{2+} dat beschikbaar blijft na complexvorming met het citraat. Dit maakt het gebruik van een regressiecurve door enkel de gemeten fluorescentieverschillen bij een hoog toegevoegd serumvolume van de standaardserumpool A mogelijk. Bij lage toegevoegde hoeveelheden van de standaardserumpool A in 180 μl eindvolume, is een grotere hoeveelheid natriumcitraatoplossing aanwezig ten opzichte van de toegevoegde hoeveelheid serumpool waardoor minder vrije Ca^{2+} aanwezig is door een grotere complexvorming met citraat. Dit resulteert in een niet-systematische fluorescentieverandering bij gebruik van lagere hoeveelheden serumpool. Uitgaande van de eerder bekomen resultaten van de β -galactosidase-enzymactiviteitbepaling van PMA-geactiveerde leukocyten (Tabel 6) wordt een lage membraangebonden neuraminidase-enzymactiviteit verwacht bij PMA-geactiveerde leukocyten gedurende de eerste uren van incubatie met serum. Voor het meten van neuraminidase-enzymactiviteiten die beduidend lager zijn dan de enzymactiviteit van het vrije neuraminidase aanwezig in de standaardserumpool A, is er nood aan een nieuwe methode voor het bekomen van de nodige ijkcurve die in de toekomst verder uitgewerkt dient te worden.

De inspiratie voor het opstellen van een toekomstig nieuwe methode, kan gehaald worden uit de neuraminidase-enzymactiviteitsmeting uitgevoerd door Marathe *et al.* (2013) [79]. Voor het opstellen van de ijkcurve wordt voorgesteld om gebruik te maken van gekende 4-MU-verdunningen. De verdunningsreeks wordt hierbij opgesteld in een enzymbuffer met pH 6,5 bestaande uit 32,5 mM 2-(N-morpholino)ethaanzwavelzuur (MES) en 4 mM CaCl_2 . Een constant volume van de 4-MU-verdunningsreeks kan aangebracht worden in microtiterwellen waarna de emissiesignalen worden gemeten bij 460 nm na excitatie door licht met een specifieke golflengte van 340 nm. Voor het bekomen van een lineaire ijkcurve, kunnen de gemeten fluorescentiesignalen uitgezet worden in functie van de 4-MU-concentratie (Figuur 21).



Figuur 21: Standaardcurve van 4-MU-verdunningsreeks (pH 6,5 en 37°C) bij excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 360 nm en 460 nm [79]

Na het opstellen van de nodige ijkcurve, wordt aangeraden om een analoog experiment uit te voeren als de enzymactiviteitsbepaling van membraangebonden β -galactosidase aanwezig op PMA-geactiveerde leukocyten. Hierbij zullen 2 miljoen WBC worden afgezonderd van de behandelde buffycoatstalen en geactiveerd worden met PMA. 100% serum of 10% serum met groeimedium wordt toegevoegd aan de geactiveerde leukocyten tot een eindvolume van 5 ml waarna het mengsel variabele tijdsduur wordt geïncubeerd op 37°C onder constante zachte menging. De incubatie wordt best uitgevoerd in 7 aparte proefbuizen, elk met een gelijk volume serum en een gelijke hoeveelheid geactiveerde leukocyten. Elk uur wordt het mengsel in één proefbuis gecentrifugeerd op 250 g gedurende 10 minuten waarna het supernatant, bestaande uit celvrij serum na incubatie, wordt afgezonderd van de neergeslagen celfractie.

Om verdere enzymactiviteitsmetingen van de membraangebonden neuraminidase mogelijk te maken, worden de cellen terug in suspensie gebracht door toevoeging van 500 μ l enzymbuffer. MES, aanwezig in de enzymbuffer met een concentratie van 32,5 mM, is een ionische oplossing dat gebruikt wordt bij biologisch onderzoek. MES oefent een groter stabiliserend effect uit op de secundaire eiwitstructuur dan conventionele ionische vloeistoffen waardoor het neuraminidase stabiel blijft tijdens het uitvoeren van de fluorescentiemeting [80]. Neuraminidase is een calcium-afhankelijk enzym waardoor er nood is aan vrije Ca^{2+} , welke aan de enzymbuffer wordt toegevoegd onder de vorm van CaCl_2 (4 mM).

De neuraminidase-enzymactiviteit van zowel de vrije enzymen in het celvrij serum voor en na incubatie als de membraangebonden enzymen op de geactiveerde leukocyten na incubatie, kan bepaald worden met behulp van de Victor X4 Multilabel Plate Reader. Hierbij wordt een vast volume van het substraat MUNANA, opgelost in enzymbuffer, toegevoegd aan een vast volume celvrij serum of terug in suspensie gebrachte cellen. Het aanwezige neuraminidase in de stalen zorgt voor de enzymatische hydrolyse van het substraat MUNANA waardoor het fluorochroom 4-MU wordt afgesplitst. Met behulp van de vooropgestelde ijkcurve, wordt de neuraminidase-enzymactiviteit bepaald uitgaande van het gemeten fluorescentiesignaal en de tijd.

Verder onderzoek naar de gebruikte staal- en substraatvolumes alsook naar de substraatconcentratie voor het bekomen van een representatieve ijkcurve, dient uitgevoerd te worden als optimalisatie van de methode. De verandering in membraangebonden en vrije neuraminidase, respectievelijk aanwezig op het plasmamembraan van PMA-geactiveerde T-cellen en in het celvrij serum, na incubatie in 100% serum of 10% serum met groeimedium wordt bestudeerd. Aangezien de transformatie van Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF wordt bekomen door een samenwerking van de enzymen β -galactosidase en neuraminidase, dienen de bekomen resultaten van beide enzymactiviteitsmetingen in achtung gebracht te worden voordat er een besluit kan worden gevormd over de mogelijkheid om geactiveerde leukocyten te gebruiken voor de in vitro productie van GcMAF.

6 Besluit

Het Gc-macrofaagactiverend proteïne (GcMAF) is een plasmaproteïne dat uitgaande van Gc-globuline gevormd wordt door enzymatische deglycosylatie en beschikt over macrofaagactiverende eigenschappen waardoor het mogelijk toegediend kan worden als adjuvans voor het natuurlijk afweersysteem. Om verder onderzoek naar de specifieke eigenschappen en werking van GcMAF mogelijk te maken, dient er een methode op punt gesteld te worden voor de in vitro productie van dit macrofaagactiverend proteïne. Dit onderzoek bestudeerde de mogelijkheid om membraangebonden β -galactosidase en neuraminidase op respectievelijk geactiveerde humane B- en T-cellen in te zetten voor de in vitro transformatie van serum Gc1F- en Gc2-globuline tot GcMAF.

De enzymactiviteit van membraangebonden β -galactosidase werd bepaald door emissiemetingen van het fluorescerend product 4-MU dat vrijkomt na enzymatische hydrolyse van het substraat 4-MUGal. PMA-geactiveerde B-cellen werden variabele tijd geïncubeerd in verschillende verdunningen van humaan serum. De grootste β -galactosidase-enzymactiviteitstijging werd waargenomen na incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten in 100% serum. Een relatieve enzymactiviteit van 300% na 6 uur incubatie in 100% serum ten opzichte van 0 uur incubatie werd waargenomen. Bij het gebruik van een mixed leukocyt culture, bekomen door het samenvoegen van geïsoleerde leukocyten van verschillende personen, wordt een snellere membraangebonden β -galactosidase-enzymexpressie waargenomen dan bij gebruik van leukocyten afkomstig van éénzelfde persoon. De bekomen resultaten geven een positieve indicatie dat geactiveerde B-cellen kunnen worden gebruikt voor de eerste deglycosylerende reactie van serum Gc1F- en Gc2-globuline voor het bekomen van GcMAF.

Voor het meten van neuraminidase-enzymactiviteiten in onbekende stalen, is er nood aan het opstellen van een ijkcurve. Een variërende hoeveelheid serumstaal werd aangelengd tot 20 μ l en 50 μ l in PBS waarna respectievelijk 80 μ l en 50 μ l natriumcitraatoplossing (50 mM, pH 8) werd toegevoegd. Vervolgens werd 80 μ l substraat MUNANA aan alle microtiterwellen bijgevoegd. Het aanwezige neuraminidase in het serum zorgt voor de enzymatische hydrolyse van het substraat MUNANA waardoor het fluorochroom 4-MU wordt afgesplitst. Het fluorescent signaal van het gevormde product werd elke 3 minuten bij 460 nm gemeten gedurende een totale reactietijd van 24 minuten, na excitatie met licht bij een golflengte van 340 nm. Het gemeten fluorescentieverschil tussen de meting na 12 minuten en 0 minuten reactietijd van de verschillende standaardoplossingen met het substraat werd uitgezet in een curve waarbij de hoeveelheid toegevoegd onverdund serum op de x-as werd geplaatst met het overeenkomstige fluorescentieverschil op de y-as. Onregelmatige resultaten werden bekomen bij het gebruik van de natriumcitraatoplossing, wellicht door de vorming van een complex tussen het natriumcitraat en het vrije calcium aanwezig in het serum. Doordat neuraminidase een calciumafhankelijk enzym is, zorgde de daling van de vrije calciumconcentratie voor een dalende enzymatische werking van het neuraminidase waardoor er geen eenduidig verband werd bekomen tussen de toegevoegde hoeveelheid onverdund serum en het gemeten fluorescentieverschil. Als optimalisatie van de methode wordt voorgesteld om gebruik te maken van een enzymbuffer, opgebouwd uit 32,5 mM 2-(N-morpholino)ethaanzwavelzuur (MES) en 4 mM CaCl_2 .

Voor het opstellen van de ijkcurve wordt het gebruik van een gekende 4-MU-verdunningsreeks voorgesteld, bekomen door verdunning met de enzymbuffer, waarbij het gemeten fluorescent signaal wordt uitgezet ten opzichte van de 4-MU-concentratie voor het bekomen van een lineaire ijkcurve. Voordat een eenduidige conclusie kan getroffen worden over de mogelijkheid om PMA-geactiveerde humane B- en T-cellen in te zetten voor de transformatie van Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF, dient de verandering in membraangebonden neuraminidase-enzymactiviteit op geactiveerde T-cellen bij incubatie met humaan serum te worden onderzocht.

Als verder onderzoek dient het mogelijk gevormde GcMAF in het humaan serum na incubatie met PMA-geactiveerde leukocyten te worden gemeten. Om na te gaan of er productie optreedt van GcMAF, kan een semi-kwantitatieve bepaling van het serum na variabele incubatieperioden met geactiveerde leukocyten worden uitgevoerd met behulp van een Dot Blot assay. Gebiotinyleerd Helix pomatia lectine kan gecoat worden op een polyvinylideendifluoride (PVDF) membraan waarna het serum wordt toegediend voor een onrechtstreekse binding van het GcMAF aan het PVDF-membraan. Het gebonden GcMAF kan vervolgens geïdentificeerd worden door polyklonaal konijn anti-humaan Gc-globuline HRP conjugaat waarbij toegevoegd 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) enzymatisch wordt omgezet door HRP tot de vorming van een gekleurd product. Door vergelijking van de kleurintensiteit na variabele incubatietijden van humaan serum met geactiveerd leukocyten, kan een beeld gevormd worden over de hoeveelheid gevormde GcMAF. Vervolgens kan, na optimalisatie van de productie- en isolatiemethode van GcMAF, de hypothese van Douglas *et al.* (2009) op de proef gesteld worden om na te gaan of nagalase al dan niet een complex vormt met GcMAF.

Bibliografie

- [1] H. Nagasawa *et al.*, “Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity.,” *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 6A, pp. 3689–95.
- [2] P. White and N. Cooke, “The Multifunctional Properties and Characteristics of Vitamin D-binding Protein,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 11, no. 8, pp. 320–327, 2000.
- [3] M. Speeckaert, G. Huang, J. R. Delanghe, and Y. E. C. Taes, “Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 372, no. 1–2, pp. 33–42, Oct. 2006.
- [4] T. Inui *et al.*, “Case Report: GcMAF Treatment in a Patient with Multiple Sclerosis.,” *Anticancer Res.*, vol. 36, no. 7, pp. 3771–4, Jul. 2016.
- [5] E. Saburi, A. Saburi, and M. Ghanei, “Promising role for Gc-MAF in cancer immunotherapy: from bench to bedside.,” *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 8, no. 4, pp. 228–238, 2017.
- [6] J. Zhang, D. M. Habel, M. Ramadass, and R. R. Kew, “Identification of two distinct cell binding sequences in the vitamin D binding protein,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1803, no. 5, pp. 623–629, May 2010.
- [7] Hector M. Mora-Montes, E. Lopez-Romero, S. Zinker, P. Ponce-Noyola, and A. Flores-Carré on, “Purification of soluble α 1,2-mannosidase from *Candida albicans*,” 2006.
- [8] R. M. Kanan, D. B. Cook, and H. K. Datta, “Lectin immunoassay for macrophage-activating factor (Gc-MAF) produced by deglycosylation of Gc-globulin: evidence for noninducible generation of Gc-MAF.,” *Clin. Chem.*, vol. 46, no. 3, pp. 412–4, Mar. 2000.
- [9] K.-P. Huang, “The mechanism of protein kinase C activation,” *Trends Neurosci.*, vol. 12, no. 11, pp. 425–432, Jan. 1989.
- [10] J. Hrubik *et al.*, “Effect of PMA-induced protein kinase C activation on development and apoptosis in early zebrafish embryos,” 2016.
- [11] A. C. Newton, “Protein kinase C: structure, function, and regulation.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 48, pp. 28495–8, Dec. 1995.
- [12] J. M. Redondo, A. Lopez-Rivas, V. Vila, J. E. J. Cragoe, and M. Fresno, “The Role of Protein Kinase C in T Lymphocyte Proliferation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 25, pp. 17467–17470, 1988.
- [13] T. L. Rothstein and D. L. Kolber, “Peritoneal B cells respond to phorbol esters in the absence of co-mitogen.,” *J. Immunol.*, vol. 140, no. 9, pp. 2880–5, May 1988.

- [14] M.-S. Chang, B.-C. Chen, M.-T. Yu, J.-R. Sheu, T.-F. Chen, and C.-H. Lin, "Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF- κ B, but not p38 MAPK, pathways," *Cell. Signal.*, vol. 17, no. 3, pp. 299–310, Mar. 2005.
- [15] S.-K. Leang and A. C. Hurt, "Fluorescence-based Neuraminidase Inhibition Assay to Assess the Susceptibility of Influenza Viruses to The Neuraminidase Inhibitor Class of Antivirals.," *J. Vis. Exp.*, no. 122, Apr. 2017.
- [16] Sigma, "Beta-galactosidase (Gal) fluorescent activity detection kit," *Sigma-Aldrich*, 1998. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/galbul.pdf>. [Accessed: 19-Mar-2018].
- [17] S. Abbas *et al.*, "The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin D status.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 17, no. 6, pp. 1339–43, Jun. 2008.
- [18] S. Malik *et al.*, "Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes.," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–22, 2013.
- [19] C. Verboven, A. Rabijns, M. De Maeyer, H. Van Baelen, R. Bouillon, and C. De Ranter, "A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 131–136, Feb. 2002.
- [20] L. R. Otterbein, C. Cosio, P. Graceffa, and R. Dominguez, "Crystal structures of the vitamin D-binding protein and its complex with actin: Structural basis of the actin-scavenger system," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 12, pp. 8003–8008, Jun. 2002.
- [21] C. E. Powe *et al.*, "Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 21, pp. 1991–2000, Nov. 2013.
- [22] R. BOUILLON, W. H. OKAMURA, and A. W. NORMAN, "Structure-Function Relationships in the Vitamin D Endocrine System*," *Endocr. Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 200–257, Apr. 1995.
- [23] D. Feldman and J. W. Pike, *Vitamin D*, 4th ed. 2017.
- [24] T. MONSINJON, P. GASQUE, P. CHAN, A. ISCHENKO, J. J. BRADY, and M. FONTAINE, "Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells," *FASEB J.*, vol. 17, no. 9, pp. 1003–1014, Jun. 2003.

- [25] P. Mukherjee and G. M. Pasinetti, "The role of complement anaphylatoxin C5a in neurodegeneration: implications in Alzheimer's disease.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 105, no. 2, pp. 124–30, Jun. 2000.
- [26] R.-F. Guo and P. A. Ward, "ROLE OF C5A IN INFLAMMATORY RESPONSES," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, no. 1, pp. 821–852, Apr. 2005.
- [27] T. J. Kindt, R. A. Goldsby, B. A. Osborne, and J. Kuby, *Kuby immunology*. W.H. Freeman, 2007.
- [28] Gregory Makowski, *Advances in Clinical Chemistry, Volume 63*, 1st ed. Academic Press.
- [29] K. Ohkura, H. Nagasawa, Y. Uto, N. Okamura, A. Murakami, and H. Hori, "The role of Gc protein oligosaccharide structure as a risk factor for COPD.," *Anticancer Res.*, vol. 26, no. 6A, pp. 4073–8.
- [30] K. Hirota *et al.*, "Antitumor effect of degalactosylated gc-globulin on orthotopic grafted lung cancer in mice.," *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 7, pp. 2911–5, Jul. 2013.
- [31] L. J. Avila and J. Convit, "Characterization and properties of alpha-D-mannosidase of human polymorphonuclear leucocytes," *Clin. Chim. Acta*, vol. 47, pp. 335–34, 1973.
- [32] P. Heikinheimo *et al.*, "The Structure of Bovine Lysosomal α -Mannosidase Suggests a Novel Mechanism for Low-pH Activation," *J. Mol. Biol.*, vol. 327, no. 3, pp. 631–644, Mar. 2003.
- [33] R. H. Garrett and C. M. Grisham, *Biochemistry*. Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013.
- [34] B. W. Matthews, "The structure of E. coli β -galactosidase," *C. R. Biol.*, vol. 328, no. 6, pp. 549–556, Jun. 2005.
- [35] D. H. Juers, B. W. Matthews, and R. E. Huber, "*LacZ* β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance," *Protein Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 1792–1807, Dec. 2012.
- [36] E. Monti *et al.*, "Identification and expression of NEU3, a novel human sialidase associated to the plasma membrane.," *Biochem. J.*, vol. 349, no. Pt 1, pp. 343–51, Jul. 2000.
- [37] S. Katoh *et al.*, "A crucial role of sialidase Neu1 in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 161, no. 2, p. no-no, Jun. 2010.

- [38] X. Nan, I. Carubelli, and N. M. Stamatou, "Sialidase expression in activated human T lymphocytes influences production of IFN- γ ," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, no. 1, pp. 284–296, Jan. 2007.
- [39] K. E. Lukong *et al.*, "Intracellular distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 49, pp. 46172–81, Dec. 2001.
- [40] S. Pacini, G. Morucci, T. Punzi, M. Gulisano, and M. Ruggiero, "Gc protein-derived macrophage-activating factor (GcMAF) stimulates cAMP formation in human mononuclear cells and inhibits angiogenesis in chick embryo chorionallantoic membrane assay," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 60, no. 4, pp. 479–485, Apr. 2011.
- [41] S. Iida, K. Yamamoto, and T. Irimura, "Interaction of human macrophage C-type lectin with O-linked N-acetylgalactosamine residues on mucin glycopeptides.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 16, pp. 10697–705, Apr. 1999.
- [42] R. D. Cummings and R. P. McEver, *C-type Lectins*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [43] S. B. Mohamad, H. Nagasawa, Y. Uto, and H. Hori, "Tumor cell alpha-N-acetylgalactosaminidase activity and its involvement in GcMAF-related macrophage activation," *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 132, no. 1, pp. 1–8, May 2002.
- [44] M. Greco, M. De Mitri, F. Chiriaco, G. Leo, E. Brienza, and M. Maffia, "Serum proteomic profile of cutaneous malignant melanoma and relation to cancer progression: Association to tumor derived alpha-N-acetylgalactosaminidase activity," *Cancer Lett.*, vol. 283, no. 2, pp. 222–229, Oct. 2009.
- [45] N. Yamamoto, V. R. Naraparaju, M. Moore, and L. H. Brent, "Deglycosylation of Serum Vitamin D₃-Binding Protein by α -N-Acetylgalactosaminidase Detected in the Plasma of Patients with Systemic Lupus Erythematosus," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, vol. 82, no. 3, pp. 290–298, Mar. 1997.
- [46] N. Yanulinolo, V. R. Naraparaju, and S. O. Asbell, "Deglycosylation of Serum Vitamin D₃-binding Protein Leads to Immunosuppression in Cancer Patients1," *CANCER Res.*, vol. 5611, pp. 2827–28, 1996.
- [47] D. S. Rehder, R. W. Nelson, and C. R. Borges, "Glycosylation status of vitamin D binding protein in cancer patients," *Protein Sci.*, vol. 18, no. 10, pp. 2036–2042, Oct. 2009.
- [48] N. Hellings *et al.*, "Immune Mediated Protection in Multiple Sclerosis: A Role for Neurokines in Oligodendrocyte Survival and Macrophage Modulation," *Clin. Immunol.*, vol. 123, p. S137, 2007.

- [49] D. (Dieter) Marmé and N. E. Fusenig, *Tumor angiogenesis : basic mechanisms and cancer therapy*. Springer, 2008.
- [50] B. Allard, M. Turcotte, K. Spring, S. Pommey, I. Royal, and J. Stagg, “Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis,” *Int. J. Cancer*, vol. 134, no. 6, pp. 1466–1473, Mar. 2014.
- [51] M. J. Gil-Gil, C. Mesia, M. Rey, and J. Bruna, “Bevacizumab for the treatment of glioblastoma.,” *Clin. Med. Insights. Oncol.*, vol. 7, pp. 123–35, 2013.
- [52] Q. Wang *et al.*, “Novel VEGF Decoy Receptor Fusion Protein Conbercept Targeting Multiple VEGF Isoforms Provide Remarkable Anti-Angiogenesis Effect In Vivo,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e70544, Aug. 2013.
- [53] S. Pacini *et al.*, “Effect of paricalcitol and GcMAF on angiogenesis and human peripheral blood mononuclear cell proliferation and signaling,” *J. Nephrol.*, vol. 25, no. 4, pp. 577–581, 2012.
- [54] T. Inui *et al.*, “Case Report: A Non-small Cell Lung Cancer Patient Treated with GcMAF, Sonodynamic Therapy and Tumor Treating Fields.,” *Anticancer Res.*, vol. 36, no. 7, pp. 3767–70, Jul. 2016.
- [55] T. Inui *et al.*, “Clinical experience of integrative cancer immunotherapy with GcMAF.,” *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 7, pp. 2917–9, Jul. 2013.
- [56] T. Inui *et al.*, “Oral Colostrum Macrophage-activating Factor for Serious Infection and Chronic Fatigue Syndrome: Three Case Reports.,” *Anticancer Res.*, vol. 35, no. 8, pp. 4545–9, Aug. 2015.
- [57] L. Thyer *et al.*, “GC protein-derived macrophage-activating factor decreases α -N-acetylgalactosaminidase levels in advanced cancer patients.,” *Oncoimmunology*, vol. 2, no. 8, p. e25769, Aug. 2013.
- [58] A.-L. Fabre, A. Luis, M. Colotte, S. Tuffet, and J. Bonnet, “High DNA stability in white blood cells and buffy coat lysates stored at ambient temperature under anoxic and anhydrous atmosphere,” *PLoS One*, vol. 12, no. 11, p. e0188547, Nov. 2017.
- [59] Thermofisher, “DNA Purification Using Buffy Coat,” 2018. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/blog/biobanking/dna-purification-using-buffy-coat/>. [Accessed: 01-Apr-2018].
- [60] J. Vuorte, S.-E. Jansson, and H. Repo, “Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay,” *Cytometry*, vol. 43, no. 4, pp. 290–296, Apr. 2001.

- [61] A. V Chernyshev, P. A. Tarasov, K. A. Semianov, V. M. Nekrasov, A. G. Hoekstra, and V. P. Maltsev, "Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification," *J. Theor. Biol.*, vol. 251, pp. 93–107, 2008.
- [62] A. Le, P. Ngo, M. Parrish, J. Ge, and B. Engelward, "Whole blood hemolysis with isotonic ammonium chloride solution."
- [63] G. Goel, H. P. S. Makkar, G. Francis, and K. Becker, "Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals," *Int. J. Toxicol.*, vol. 26, no. 4, pp. 279–288, Jul. 2007.
- [64] Sigma-Aldrich, "PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE Sigma Prod."
- [65] "VICTOR Multilabel Plate Reader|PerkinElmer." [Online]. Available: <http://www.perkinelmer.com/nl/product/victor-x5-for-fl-lum-uv-trf-fp-2030-0050>. [Accessed: 31-Mar-2018].
- [66] PerkinElmer, "Victor X Multilabel Readers," 2008.
- [67] PerkinElmer, "VICTOR™ X Series Multilabel Plate Readers," 2008.
- [68] B. Instruments, "Determination of β -Galactosidase Activity using the FL600™ Microplate Fluorescence Reader," 2006.
- [69] Joseph R. Lakowicz, "Introduction to Fluorescence," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Boston, MA: Springer US, 2006, pp. 1–26.
- [70] A. S. Al-Kady, E.-S. I. Ahmed, M. Gaber, M. M. Hussein, and E.-Z. M. Ebeid, "Kinetics of catalyzed hydrolysis of 4-methylumbelliferyl caprylate (MUCAP) salmonella reagent," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 79, no. 5, pp. 1540–1545, Sep. 2011.
- [71] S. Quosdorf, A. Schuetz, and H. Kolodziej, "Different Inhibitory Potencies of Oseltamivir Carboxylate, Zanamivir, and Several Tannins on Bacterial and Viral Neuraminidases as Assessed in a Cell-Free Fluorescence-Based Enzyme Inhibition Assay," *Molecules*, vol. 22, no. 11, p. 1989, Nov. 2017.
- [72] Merck, "TOYOPEARL® AF-Tresyl-650M Bulk Media phase tresyl-activated, bottle of 5 g, 65 μ m particle size | Sigma-Aldrich." [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/814471?lang=en®ion=BE>. [Accessed: 01-May-2018].
- [73] G. Késmárky, P. Kenyeres, M. Rábai, and K. Tóth, "Plasma viscosity: a forgotten variable.," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 39, no. 1–4, pp. 243–6, 2008.
- [74] M. M. Kuntz, J. B. Innes, and M. E. Weksler, "The cellular basis of the impaired autologous mixed lymphocyte reaction in patients with systemic lupus erythematosus.," *J. Clin. Invest.*, vol. 63, no. 1, pp. 151–3, Jan. 1979.

- [75] M. E. Weksler and R. Kozak, "Lymphocyte transformation induced by autologous cells. V. Generation of immunologic memory and specificity during the autologous mixed lymphocyte reaction.," *J. Exp. Med.*, vol. 146, no. 6, pp. 1833–8, Dec. 1977.
- [76] S. Chatterjee and S. A. Hadi, "Influential Observations, High Leverage Points, and Outliers in Linear Regression," *Stat. Sci.*, vol. 1, no. 3, pp. 379–416, 1986.
- [77] A. B. Hastings, F. C. Mclean, L. Eichelberger, J. L. Hall, and E. Da Costa, "THE IONIZATION OF CALCIUM, MAGNESIUM, AND STRONTIUM CITRATES*."
- [78] M. Lawrenz, J. Wereszczynski, R. Amaro, R. Walker, A. Roitberg, and J. A. Mccammon, "Impact of calcium on N1 influenza neuraminidase dynamics and binding free energy."
- [79] B. M. Marathe, V. Lévêque, K. Klumpp, R. G. Webster, and E. A. Govorkova, "Determination of Neuraminidase Kinetic Constants Using Whole Influenza Virus Preparations and Correction for Spectroscopic Interference by a Fluorogenic Substrate," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71401, Aug. 2013.
- [80] M. Taha, F. A. E Silva, M. V Quental, S. P. M. Ventura, M. G. Freire, and J. A. P. Coutinho, "Good's buffers as a basis for developing self-buffering and biocompatible ionic liquids for biological research.," *Green Chem.*, vol. 16, no. 6, pp. 3149–3159, Jun. 2014.

Bijlagen

Bijlage A: β -galactosidase-enzymactiviteitmetingen van serumpool B

Tabel 8: β -galactosidase-enzymactiviteit van serumpool B bij pH 4,4 en 30 minuten reactietijd met 4-MUGal op 37°C

| Meting | Gemeten β-galactosidase-enzymactiviteit (pH 4,4 en 37°C) | Gemiddelde β-galactosidase-enzymactiviteit (pH 4,4 en 37°C) |
|---------------|--|---|
| 1 | 3,17 | 3,10 |
| 2 | 2,94 | |
| 3 | 3,22 | |
| 4 | 2,85 | |
| 5 | 3,61 | |
| 6 | 3,50 | |
| 7 | 3,52 | |
| 8 | 3,59 | |
| 9 | 3,70 | |
| 10 | 3,65 | |
| 11 | 3,32 | |
| 12 | 3,45 | |
| 13 | 3,48 | |
| 14 | 3,43 | |
| 15 | 3,19 | |
| 16 | 3,48 | |
| 17 | 3,30 | |
| 18 | 3,36 | |
| 19 | 3,00 | |
| 20 | 2,87 | |
| 21 | 2,60 | |
| 22 | 2,68 | |
| 23 | 2,53 | |
| 24 | 2,68 | |
| 25 | 2,53 | |
| 26 | 2,68 | |
| 27 | 2,50 | |
| 28 | 3,88 | |
| 29 | 2,26 | |
| 30 | 2,48 | |

Bijlage B: staalvoorbereiding

1 Reagentia

- fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS)
 - 1,6 g NaCl
 - 0,04 g KCl
 - 0,288 g Na₂HPO₄·2H₂O
 - 0,048 g KH₂PO₄ } tot 200 ml met gedemineraliseerd H₂O
corrigeer tot pH 7 met 0,2 M HCl of NaOH
- ammonium chloride lysisbuffer (stockoplossing)
 - 8,02 g NH₄Cl
 - 0,84 g NaHCO₃
 - 0,37 g EDTA } tot 100 ml met gedemineraliseerd H₂O
- ammonium chloride lysisbuffer (werkoplossing)
 - verdun stockoplossing 10x met gedemineraliseerd H₂O
- groeimedium KMEM/F-12 (Thermo Fisher)

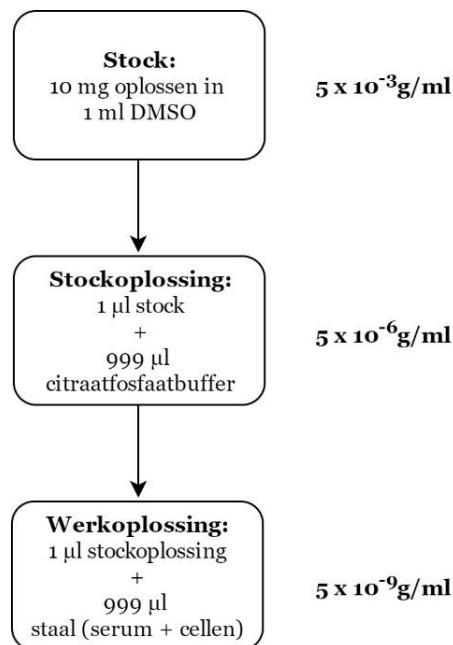
2 Werkwijze

- centrifugeer het vers citraatvolbloed gedurende 20 minuten op 1474 g
opmerking: indien nog RBC zichtbaar zijn in plasmafractie dient de duur van centrifugatie verlengt te worden;
- zonder zoveel mogelijk buffy coat af met behulp van een steriele micropipet;
- verdeel de buffy coat over steriele proefbuizen van 15 ml, elk met een buffy coat volume van 1 ml;
- voeg ammoniumchloride werkoplossing toe aan elke proefbuis tot het maximaal volume;
- laat de oplossing minstens 10 minuten staan met regelmatig omzwenken van de proefbuizen tot de oplossing helder rood ziet;
- centrifugeer voor 10 minuten op 250 g;
- wassen van de neergeslagen celfractie:
 - verwijder supernatant en laat de proefbuizen uitdruppen;
 - voeg 2 ml PBS toe aan elke proefbuis en breng de cellen in suspensie met behulp van zachte pipetering;
 - vul verder aan met PBS totdat 3/4^e van de proefbuizen gevuld is en zwenk de proefbuizen enkele malen om;
 - centrifugeer voor 10 minuten op 250 g;
 - herhaal bovenstaande wasstappen 3 maal;
- verwijder supernatant en laat de proefbuizen uitdruppen;
- breng de leukocytenpellet terug in suspensie door toevoeging van groeimedium DMEM/F-12 en voeg de in suspensie gebrachte leukocyten bij elkaar;
- nagaan van vitaliteit van de geïsoleerde celfractie:
 - voeg 100 µl Trypan blue bij 100 µl suspensie;
 - breng een klein volume (± 10 µl) van de oplossing aan op een draagglas en bekijk het microscopisch beeld van de cellen op 20x vergroting;
- bewaar de cellen bij 37°C tot verdere analyse.

Bijlage C: β -galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 100% serum

1 Reagentia

- citraatfosfaatbuffer (pH 4,4)
 - 1,280 g citroenzuur
 - 2,372 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,780 g NaCl } tot 200 ml met gedemineraliseerd H_2O
corrigeer tot pH 7 met 0,2 M HCl of NaOH
- substraat 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (0,02 mg/ml)
 - 10 mg oplossen in 1 ml DMSO
 - 10x verdunnen in citraatfosfaatbuffer (=substraat stockoplossing)
 - 50x verdunnen in citraatfosfaatbuffer (=substraat werkoplossing)
- stopoplossing NaOH (0,125 M)
 - 1 g NaOH aanlengen tot 200 ml met gedemineraliseerd H_2O
- forbol-12-meristaat-13-acetaat (PMA) (Figuur 22)

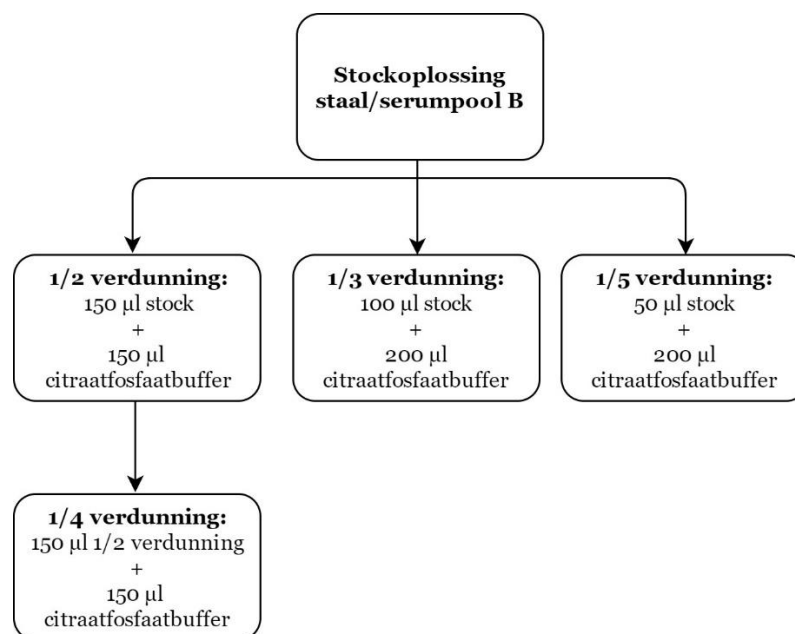


Figuur 22: PMA verdunningsreeks

2 Werkwijze

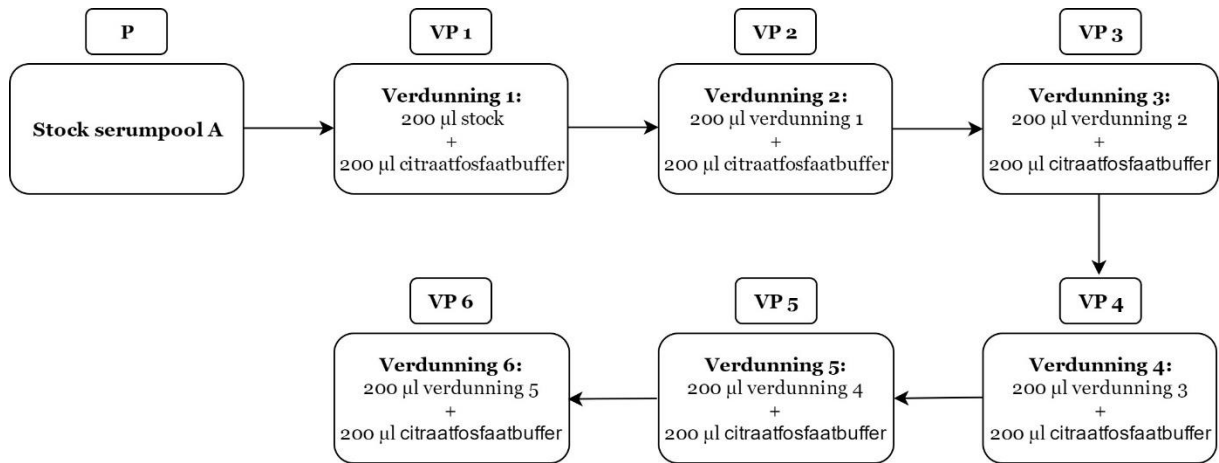
- centrifugeer de oplossing van cellen in groeimedium, bekomen na de staalvoorbereiding, gedurende 10 minuten op 250 g;
- verwijder het supernatant en voeg 3 ml nieuw groeimedium toe;
- tel de levende WBC:
 - voeg 100 µl Trypan blue bij 100 µl suspensie;
 - breng 10 µl van de oplossing aan op het draagglas van de counting chamber (Makler);
 - tel het aantal kleurloze cellen binnen het grote vierkant (10 rijen van 10 vakjes);
 - veeg de telkamer proper, breng opnieuw 10 µl van de oplossing aan op het draagglas en voer de tellen een tweede maal uit;

- o deel het totaal aantal getelde levende cellen door 20 voor het bekomen van het aantal levende WBC (in miljoen) per ml
→ Opgelet: rekening houden met verdunningsfactor (x2)
- bereiden van stalen voor incubatie op 37°C:
 - o zonder het nodige volume af van cellen in medium voor ongeveer 2 miljoen WBC;
 - o voeg vers serum van serumpool B (100% serum) toe tot een eindvolume van 4995 µl voor het experiment met toevoeging van PMA of tot een eindvolume van 5000 µl voor het experiment zonder toevoeging van PMA;
 - o voeg 5 µl PMA toe aan de nodige stalen;
- incubeer de stalen op 37°C gedurende verschillende tijdsduur;
- meng, na incubatie, de stalen op met behulp van zachte pipetering;
- maak een verdunningsreeks van het serumpool B voor incubatie (Figuur 23);



Figuur 23: Verdunningsreeks geïncubeerde staaloplossing en 100% serumpool B voor incubatie

- centrifugeer de stalen (serum+leukocyten) op 250 g voor 10 minuten;
- breng het supernatant (celvrij serum na incubatie) over in een aparte steriele proefbuis;
- breng de leukocytenpellet van het gecentrifugeerde staal na incubatie terug in suspensie met 500 µl celvrij serum;
- maak dezelfde verdunningsreeks (Figuur 23) voor het afgezonderde celvrij serumstaal na incubatie en voor de in suspensie gebrachte leukocytenfractie;
- construeer een standaardreeks van serumpool A (serumpool met gekende β-galactosidase-enzymactiviteit) (Figuur 24);



Figuur 24: Standaardreeks serumpool A

- aanbrengen op microtiterplaat (Tabel 9)
 - blanco:
 - 20 µl citraatfosfaatbuffer;
 - standaardreeks serumpool A:
 - 20 µl van de stockoplossing of verdund serumpool A;
 - staaloplossing (cellen+serum), leukocytenfractie en serum na incubatie:
 - vul de microtiterwellen met 10 µl buffer en voeg vervolgens 10 µl van de stockoplossing of verdunde oplossingen toe;

Tabel 9: Positie op microtiterplaat

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| A | P | VP1 | VP2 | VP3 | VP4 | VP5 | VP6 | Bl | SVI | SVI 1/2 | SVI 1/3 | SVI 1/4 |
| B | SVI 1/5 | SNI | SNI 1/2 | SNI 1/3 | SNI 1/4 | SNI 1/5 | St | St 1/2 | St 1/3 | St 1/4 | St 1/5 | LF |
| C | LF 1/2 | LF 1/3 | LF 1/4 | LF 1/5 | SVI | SVI 1/2 | SVI 1/3 | SVI 1/4 | SVI 1/5 | SNI | SNI 1/2 | SNI 1/3 |
| D | SNI 1/4 | SNI 1/5 | St | St 1/2 | St 1/3 | St 1/4 | St 1/5 | LF | LF 1/2 | LF 1/3 | LF 1/4 | LF 1/5 |
| E | VP6 | VP5 | VP4 | VP3 | VP2 | VP1 | P | Bl | | | | |

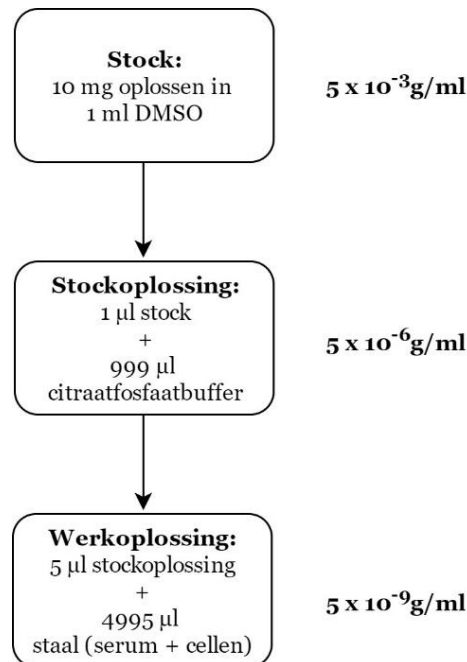
Legende: stockoplossing standaardserumpool A (P), verdunningen standaardserumpool A (VP), blanco (Bl), stockoplossing 100% serumpool B voor incubatie met leukocyten (SVI), verdund 100% serumpool B voor incubatie (SVI 1/...), stockoplossing 100% serumpool B na incubatie (SNI), verdund 100% serumpool B na incubatie (SNI 1/...), stockoplossing van het staal met leukocyten in serum na incubatie (St), verdunningen van het staal na incubatie (St 1/...), stockoplossing van de leukocytenfractie na incubatie (LF) en de verdunningen van de leukocytenfractie na incubatie (LF 1/...)

- start de procedure 'MU acid kinetics' waarbij
 - 80 μ l substraatwerkoplossing wordt toegevoegd aan elke microtitercup via pomp 2;
 - de microtiterplaat 30 minuten wordt geïncubeerd op 37°C met schudden;
 - reactie stopt door toevoegen van 100 μ l NaOH (0,125 M) via pomp 1;
 - de emissie wordt gemeten bij 460 nm.

Bijlage D: β -galactosidaseactiviteitmeting leukocyten bij incubatie in 10% serum

1 Reagentia

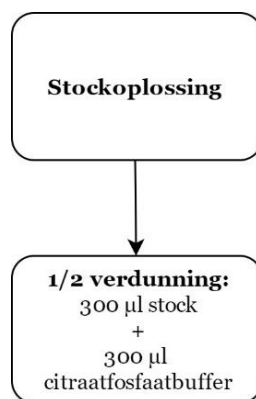
- citraatfosfaatbuffer (pH 4,4)
 - 1,280 g citroenzuur
 - 2,372 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,780 g NaCl } tot 200 ml met gedemineraliseerd H_2O
corrigeer tot pH 7 met 0,2 M HCl of NaOH
- substraat 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside
 - 10 mg oplossen in 1 ml DMSO
 - 10x verdunnen in citraatfosfaatbuffer (=substraat stockoplossing)
 - 50x verdunnen in citraatfosfaatbuffer (=substraat werkoplossing)
- stopoplossing NaOH (0,250 M)
 - 2 g NaOH aanlengen tot 200 ml met gedemineraliseerd H_2O
- fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS)
 - 1,6 g NaCl
 - 0,04 g KCl
 - 0,288 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,048 g KH_2PO_4 } tot 200 ml met gedemineraliseerd H_2O
corrigeer tot pH 7 met 0,2 M HCl of NaOH
- forbol-12-meristaat-13-acetaat (PMA) (Figuur 25)



Figuur 25: PMA verdunningsreeks

2 Werkwijze

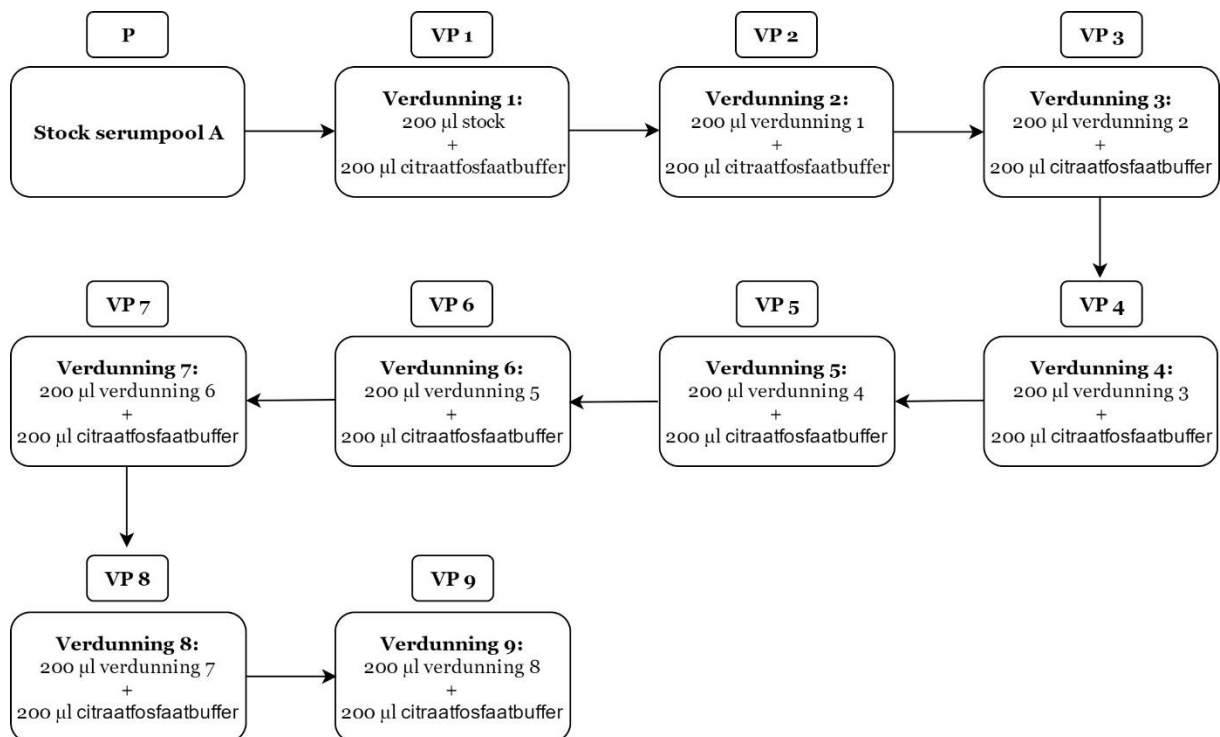
- centrifugeer de oplossing van cellen met groeimedium, bekomen na de staalvoorbereiding, gedurende 10 minuten op 250 g voor de cellen te laten neerzakken;
- verwijder het supernatant en voeg 3 ml nieuw groeimedium toe;
- tel de levende WBC:
 - voeg 100 μ l Trypan blue bij 100 μ l suspensie;
 - breng 10 μ l van de oplossing aan op het draagglas van de counting chamber (Makler);
 - tel het aantal kleurloze cellen binnen het grote vierkant (10 rijen van 10 vakjes);
 - veeg de telkamer proper, breng opnieuw 10 μ l van de oplossing aan op het draagglas en voer de tellen een tweede maal uit;
 - deel het totaal aantal getelde levende cellen door 20 voor het bekomen van het aantal levende WBC (in miljoen) per ml
→ Opgelet: rekening houden met verdunningsfactor (x2)
- maak de 10% serumpool B door samenvoegen van 1 ml serumpool B met 9 ml PBS of groeimedium;
- bereiden van stalen voor incubatie op 37°C:
 - zonder het nodige volume af van cellen in medium voor ongeveer 2 miljoen WBC;
 - voeg vers serum van de serumpool B verdunning (10% serum) toe tot een eindvolume van 4995 μ l;
 - voeg 5 μ l PMA toe;
- incubeer de stalen op 37°C gedurende verschillende tijdsduur;
- meng, na incubatie, de stalen op met behulp van zachte pipetering;
- maak een verdunningsreeks van 10% serumpool B in PBS of groeimedium voor incubatie (Figuur 26);



Figuur 26: Verdunningsreeks 10% serumpool B in PBS of groeimedium voor incubatie

- centrifugeer de stalen (serum+leukocyten) op 250 g voor 10 minuten;
- breng het supernatant (celvrij 10% serum na incubatie) over in een aparte steriele proefbuis;
- breng de leukocytenpellet van het gecentrifugeerde staal na incubatie terug in suspensie met 500 μ l PBS;

- maak dezelfde verdunningsreeks (Figuur 26) voor het afgezonderde celvrij serumstaal na incubatie en voor de in suspensie gebrachte leukocytenfractie;
- construeer een standaardreeks van standaardserumpool A (serumpool met gekende β -galactosidase-enzymactiviteit) (Figuur 27);



Figuur 27: Standaardreeks serumpool A

- aanbrengen op microtiterplaat (Tabel 10)
 - blanco:
100 µl citraatfosfaatbuffer;
 - standaardreeks serumpool A:
vul de microtiterwellen met 80 µl buffer en voeg vervolgens 20 µl van de stockoplossing en verdunde oplossingen toe;
 - staaloplossing (cellen+serum), leukocytenfractie en serum na incubatie:
100 µl stockoplossing of verdunde oplossing;

Tabel 10: Positie op microtiterplaat

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------|-----|------------|-----|-----------|-----|-----------|-----|------------|-----|------------|-----|
| A | P | VP1 | VP2 | VP3 | VP4 | VP5 | VP6 | VP7 | VP8 | VP9 | Bl | SVI |
| B | SVI 1/2 | SNI | SNI 1/2 | St | St 1/2 | LF | LF 1/2 | SVI | SVI 1/2 | SNI | SNI 1/2 | St |
| C | St 1/2 | LF | LF 1/2 | VP9 | VP8 | VP7 | VP6 | VP5 | VP4 | VP3 | VP2 | VP1 |
| D | P | Bl | | | | | | | | | | |

Legende: stockoplossing standaardserumpool A (P), verdunningen standaardserumpool A (VP), blanco (Bl), stockoplossing 10% serumpool B voor incubatie met geactiveerde leukocyten (SVI), verdund 10% serumpool B voor incubatie (SVI 1/2), stockoplossing 10% serumpool B na incubatie (SNI), verdund 10% serumpool B na incubatie (SNI 1/2), stockoplossing van het staal met leukocyten in serum na incubatie (St), verdunningen van het staal na incubatie (St 1/2), stockoplossing van de leukocytenfractie na incubatie (LF) en de verdunningen van de leukocytenfractie na incubatie (LF 1/2)

- start de procedure ‘MU acid kinetics’ waarbij
 - 80 µl substraatwerkoplossing wordt toegevoegd aan elke microtitercup via pomp 2;
 - de microtiterplaat 30 minuten wordt geïncubeerd op 37°C met schudden;
 - reactie stopt door toevoegen van 50 µl NaOH (0,250 M) via pomp 1;
 - de emissie wordt gemeten bij 460 nm.

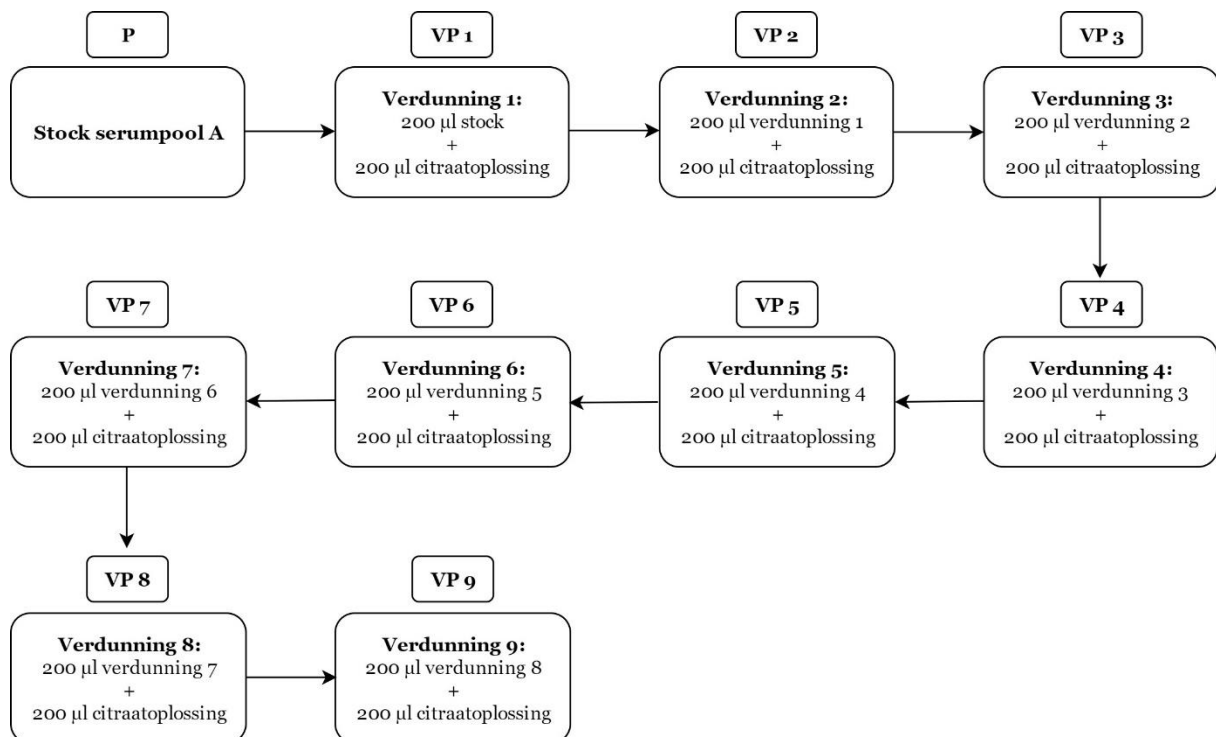
Bijlage E: testen van reactieomstandigheden voor het opstellen van de ijkcurve voor neuraminidase-enzymactiviteitsbepaling

1 Reagentia

- natriumcitraat stockoplossing (100 mM, pH 8 of pH4)
2,941 g natriumcitraat aanlengen met gedemineraliseerd H₂O tot 200 ml
corrigeer tot pH 8 of pH 4 met 2 M NaOH
- natriumcitraat werkoplossing (60 mM, pH 8 of pH 4)
6 ml stockoplossing aanlengen met gedemineraliseerd H₂O tot 10 ml
- 2-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminezuur (0,25 mg/ml)
10 mg oplossen in 20 ml citraatoplossing stock (100 mM, pH 8 of pH 4)
1:2 verdunnen met natriumcitraat werkoplossing
- fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS)
1,6 g NaCl
0,04 g KCl
0,288 g Na₂HPO₄·2H₂O
0,048 g KH₂PO₄ } tot 200 ml met gedemineraliseerd H₂O
corrigeer tot pH 7 met 0,2 M HCl of NaOH

2 Werkwijze

- construeer een standaardreeks van standaardserumpool A (Figuur 28);



Figuur 28: Standaardreeks serumpool A

- aanbrenge op microtiterplaat (Tabel 11);
 - blanco:
80 µl of 50 µl natriumcitraatoplossing + 20 µl of 50 µl PBS;
 - standaardreeks serumpool A:
80 µl of 50 µl natriumcitraatoplossing + 20 µl of 50 µl serumpool A;
 - substraat:
voeg 80 µl substraat toe aan alle gevulde microtiterwellen;

Tabel 11: Positie op microtiterplaat

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|
| A | P | VP1 | VP2 | VP3 | VP4 | VP5 | VP6 | VP7 | VP8 | VP9 | Bl | P |
| B | VP1 | VP2 | VP3 | VP4 | VP5 | VP6 | VP7 | VP8 | VP9 | | | |

Legende: stockoplossing standaardserumpool A (P), verdunningen standaardserumpool A (VP) en blanco (Bl)

- start de procedure ‘umbelliferon 3s’ waarbij
 - de microtiterplaat 24 minuten wordt geïncubeerd op 37°C met schudden;
 - fluorescentiesignaal elke 3 minuten wordt gemeten bij 460 nm na excitatie door licht met een golflengte van 340 nm.

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:
Transformatie van Gc-globuline tot GcMAF

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**
Jaar: **2018**

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,

Conings, Gudrun

Datum: **11/06/2018**