

2018 • 2019  
Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen  
master in de industriële wetenschappen: biochemie

**Masterthesis**  
Kankerscreening op basis van nagalase & nagalase-DBP-complex

PROMOTOR :  
ing. Liesbet PAULS

PROMOTOR :  
ing. Bart THEWISSEN

COPROMOTOR :  
Dhr. Eugène BOSMANS

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

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



2018•2019

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen  
master in de industriële wetenschappen: biochemie

## Masterthesis

Kankerscreening op basis van nagalase & nagalase-DBP-complex

**PROMOTOR :**

ing. Liesbet PAULS

**PROMOTOR :**

ing. Bart THEWISSEN

**COPROMOTOR :**

Dhr. Eugène BOSMANS

### Laurens Ignoul

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



**KU LEUVEN**



## Woord vooraf

De afgelopen 3 maanden heb ik gewerkt en geschreven aan mijn masterproef bij het bedrijf Epsilon Biotech. Het was een hele ervaring om deze maanden als stagiair mee te draaien in het bedrijf en mee te helpen in het onderzoek naar nagalase en DBP-MAF. Ik hoop dat ik op deze manier mijn steentje heb kunnen bijdragen aan het onderzoek naar kanker. Met deze masterproef zit ik nu in de laatste rechte lijn naar mijn diploma industrieel ingenieur. Dit zou niet gelukt zijn zonder de steun en vertrouwen van een aantal personen, daarom zou ik hen graag nog een woord van dank toespreken.

Eerst zou ik graag mijn externe promotors, dhr. Eugene Bosmans en ing. Bart Thewissen bedanken voor de goede begeleiding en hulp tijdens de afgelopen maanden. De uitgebreide kennis die jullie met mij gedeeld hebben ga ik zeker nog kunnen gebruiken in het verdere verloop van mijn professionele carrière. Het was een zeer aangename en leerrijke periode die mij nog lang zal bijblijven. Ook zou ik mijn interne promotor ing. Liesbet Pauls willen bedanken voor de ondersteuning en hulp bij het schrijven van deze masterproef. Uw constructieve opmerkingen en suggesties hebben mij geholpen tot een goed eindresultaat. Vervolgens zou ik nog mijn medestudent Bjorn Smeets willen bedanken voor de fijne momenten en hulp tijdens de stageperiode. Tot slot wil ik ook mijn ouders, familie en vriendin Eline bedanken voor de steun gedurende mijn hele studiecarière.



# Inhoud

Woord vooraf.....	1
Lijst van tabellen.....	7
Lijst van figuren.....	9
Verklarende woordenlijst.....	13
Abstract.....	15
Abstract in English.....	17
1 Inleiding.....	19
1.1 Situering.....	19
1.2 Probleemstelling.....	20
1.3 Doelstellingen.....	21
1.4 Methode.....	22
2 Vitamine D bindend proteïne.....	23
2.1 Structuur.....	23
2.2 Functies.....	24
2.2.1 Vitamine D transport.....	24
2.2.2 Actine scavenging.....	26
2.2.3 Vetzuurtransport.....	27
2.2.4 Chemotaxis.....	27
2.2.5 Rol in het immuunsysteem.....	27
2.3 DBP-macropaag activerende factor (DBP-MAF).....	28
2.3.1 Vorming.....	28
2.3.2 Functies.....	28
3 $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase.....	31
3.1 Structuur.....	31
3.2 Functie.....	31
3.3 Ziektes.....	32
3.3.1 Kanker.....	32
3.3.2 Ziekte van Schindler.....	32
4 Tumormerkers.....	33
5 Materiaal en methode.....	35
5.1 Materiaal.....	35
5.1.1 Stalen.....	35
5.1.2 Reagentia.....	35

5.1.3	Victor Plate Reader .....	36
5.2	Methode .....	36
5.2.1	Complexmeting .....	36
5.2.2	Nagalase-activiteit meting.....	38
5.2.3	ROC curve .....	39
5.2.4	Ratio van het complex t.o.v. de mediaan van de normale controles.....	40
6	Resultaten .....	41
6.1	Complexbepaling .....	41
6.2	Staalmetingen.....	41
6.2.1	Vergelijking met alle kankerstalen.....	42
6.2.2	CA125.....	48
6.2.3	CA153.....	54
6.2.4	CA199.....	61
6.2.5	CEA.....	67
6.2.6	PSA .....	74
6.3	Ratio ten opzichte van de mediaan.....	80
7	Discussie .....	83
7.1	Complexmeting .....	83
7.2	Vrije nagalase .....	83
7.3	Totale nagalase.....	83
7.4	Verschil in nagalase.....	83
7.5	Ratio ten opzichte van de mediaan.....	84
8	Conclusie .....	85
	Verder onderzoek.....	87
	Bibliografie .....	89
	Bijlagen.....	95
	Bijlage 1: Protocol voor de sandwich ELISA van het complex .....	95
	Reagentia .....	95
	Methode .....	97
	Bijlage 2: Protocol nagalasesmetingen met <i>fluorescence assay</i> (dissociatie complex) .....	99
	Reagentia .....	99
	Methode.....	99
	Bijlage 3: Data van de normale controles .....	100
	Bijlage 4: Data van de verhoogde CA125 stalen.....	101

Bijlage 5: Data van verhoogde CA153 stalen.....	102
Bijlage 6: Data van verhoogde CA199 stalen.....	103
Bijlage 7: Data van verhoogde PSA stalen .....	104
Bijlage 8: Data van verhoogde CEA stalen .....	105
Bijlage 9: Data van patiënt met darmkanker in functie van de tijd.....	106





## Lijst van tabellen

TABEL 1: DE VERSCHILLENDE TUMORMERKERS MET DE BIJHORENDE KANKERS [48].	33
TABEL 2: OVERZICHT VAN DE GEGEVENS VAN DE NORMALE CONTROLES.	41
TABEL 3: OVERZICHT VAN GEGEVENS VAN ALLE GEMETEN STALEN.	48
TABEL 4: OVERZICHT VAN DE GEGEVENS VAN CA125.	54
TABEL 5: OVERZICHT VAN DE GEGEVENS VAN CA153.	61
TABEL 6: OVERZICHT VAN DE GEGEVENS VAN CA199.	67
TABEL 7: OVERZICHT VAN DE GEGEVENS VAN CEA.	74
TABEL 8: OVERZICHT VAN DE GEGEVENS VAN PSA.	79
TABEL 9: GEGEVENS VAN PATIËNT OPGEVOLGD IN TIJD.	80
TABEL 10: PERCENTIELEN VAN DE RATIO'S VAN DE COMPLEXMETINGEN VOOR DE NORMALE CONTROLES.	81
TABEL 11: OVERZICHT VAN DE GEGEVENS VAN ALLE KANKERSTALEN.	84



## Lijst van figuren

FIGUUR 1: CASCADE VAN DBP TOT DBP-MAF, DE DEGLYCOSYLATIE VAN DBP EN DE VORMING VAN HET COMPLEX [7].	20
FIGUUR 2: HET PRINCIPE VAN SANDWICH ELISA [9].	21
FIGUUR 3: A. PLAATS VAN HET GEN CODEREND VOOR HET VITAMINE D BINDEND PROTEÏNE OP CHROMOSOOM 4 (4Q12-Q13) [50] B. DE AMINOZUURSEQUENTIE VAN HET VITAMINE D-BINDEND PROTEÏNE MET DE 3 DOMEINEN. [7].	23
FIGUUR 4: HET METABOLISME VAN VITAMINE D [23].	25
FIGUUR 5: A. DE WERKING VAN EEN STEROÏDE HORMOON ALS SIGNAALMOLECULE GEBEURT OP 2 MANIEREN: GENOMISCH EN VIA RECEPTORBINDING. [48]. B. TRANSPORT EN MIGRATIE VAN VITAMINE D NAAR DE CEL. A) VRIJ MIGRATIE VAN 25D NAAR DE CEL. B) VRIJE MIGRATIE VAN 1,25D NAAR DE CEL. C) MIGRATIE VAN 25D GEBONDEN AAN DBP VIA RECEPTOR D) MIGRATIE VAN 1,25D GEBONDEN AAN DBP VIA RECEPTOR [49].	26
FIGUUR 6: CASCADE VAN DBP TOT DBP-MAF, DE DEGLYCOSYLATIE VAN DBP EN DE VORMING VAN HET COMPLEX [7].	28
FIGUUR 7: LINTDIAGRAMMEN VAN NAGALASE (BEKEKEN LANGS 2 KANTEN) BESTAANDE UIT 2 DOMEINEN: HET EERSTE DOMEIN BESTAAT UIT EEN (B/A) <sub>8</sub> VAT EN HET TWEEDE DOMEIN BESTAAT UIT 8 ANTIPARALLELE B STRENGEN [45].	31
FIGUUR 8: REACTIE VAN NAGALASE WAARBIJ A-N-ACETYL GALACTOSE OF A-GALNAC AFGESPLITST WORDT VAN EEN GLYCOLIPIDE OF GLYCOPROTEÏNE (R <sup>1</sup> IS HET PROTEÏNE DEEL) [45].	32
FIGUUR 9: DE VICTOR X4 MULTILABEL PLATE READER.	36
FIGUUR 10: HET PRINCIPE VAN SANDWICH ELISA [9].	36
FIGUUR 11: DE REACTIE VAN TMB TOT EEN BLAUW PRODUCT. DOOR HET TOEVOEGEN VAN DE STOPOPLUSSING GEBEURT ER EEN KLEUROMVORMING VAN BLAUW NAAR GEEL [51].	37
FIGUUR 12: PRINCIPE VAN DE METING VAN DE NAGALASEACTIVITEITEN. DOOR HET TOEVOEGEN VAN AMMONIUMSULFAAT ZAL HET COMPLEX DISSOCIËREN. DBP = VITAMINE D BINDEND PROTEÏNE, NAGA = NAGALASE, MUNAGA = 4-METHYLLUMBELLIFERYL-A-N-ACETYL-D-GALACTOSAMINIDE.	39
FIGUUR 13: A. GRAFIEK MET DE FALSE EN TRUE POSITIVES EN NEGATIVES IN FUNCTIE VAN DE TESTRESULTATEN. B. GRAFIEK MET DE SPECIFICITEIT, SENSITIVITEIT, TRUE NEGATIVES EN TRUE POSITIVES IN FUNCTIE VAN DE CRITERION VALUE. C. EEN VOORBEELD VAN EEN ROC-CURVE [51].	40
FIGUUR 14: RESULTATEN VAN DE SANDWICH ELISA VOOR HET COMPLEX.	41
FIGUUR 15: ROC-CURVE VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN ALLE GEMETEN STALEN (KANKERSTALEN EN NORMALE CONTROLES). AUC = AREA UNDER CURVE.	42
FIGUUR 16: BOX-PLOT VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN ALLE GEMETEN STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": KANKERSTALEN	43
FIGUUR 17: ROC-CURVE VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN ALLE GEMETEN STALEN (KANKERSTALEN EN NORMALE CONTROLES). AUC = AREA UNDER CURVE.	43
FIGUUR 18: BOX-PLOT VAN DE VRIJE NAGALASE VAN ALLE GEMETEN STALEN (KANKERSTALEN EN NORMALE CONTROLES). "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": KANKERSTALEN	44
FIGUUR 19: ROC-CURVE VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN ALLE GEMETEN STALEN (KANKERSTALEN EN NORMALE CONTROLES). AUC = AREA UNDER CURVE.	45
FIGUUR 20: BOX-PLOT VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN ALLE GEMETEN KANKERSTALEN. "CAT=0": NORMALE CONTROLE, "CAT=1": KANKERSTALEN.	45

FIGUUR 21: ROC-CURVE VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN ALLE STALEN (KANKERSTALEN EN NORMALE CONTROLES). AUC = AREA UNDER CURVE .....	46
FIGUUR 22: BOX-PLOT VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN ALLE STALEN (KANKERSTALEN EN NORMALE CONTROLES). "CAT=0": NORMALE CONTROLES, "CAT=1": KANKERSTALEN.....	47
FIGUUR 23: ROC-CURVE VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE CA125 STALEN EN NORMALE CONTROLES. AUC = AREA UNDER CURVE.....	48
FIGUUR 24: BOX-PLOT VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE CA125 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": VERHOOGDE CA125 STALEN .....	49
FIGUUR 25: ROC-CURVE VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA125 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	50
FIGUUR 26: BOX-PLOT VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA125 STALEN. "CAT=0": NORMALE CONTROLES, "CAT=1": VERHOOGDE CA125 STALEN .....	50
FIGUUR 27: ROC-CURVE VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA125 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE.....	51
FIGUUR 28: BOX-PLOT VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA125 STALEN. "CAT=0": NORMALE CONTROLES, "CAT=1": VERHOOGDE CA125 STALEN .....	52
FIGUUR 29: ROC-CURVE VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN VERHOOGDE CA125 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	52
FIGUUR 30: BOX-PLOT VAN HET VERSCHIL NAGALASE VAN DE VERHOOGDE CA125 STALEN. "CAT=0": NORMALE CONTROLES, "CAT=1": VERHOOGDE CA125 STALEN .....	53
FIGUUR 31: OVERZICHT VAN DE VERSCHILLENDE ROC-CURVES VOOR DE VERHOOGDE CA125 STALEN .....	54
FIGUUR 32: ROC-CURVE VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE CA153 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	55
FIGUUR 33: BOX-PLOT VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE CA153 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CA153 STALEN.....	56
FIGUUR 34: ROC-CURVE VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA153 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	56
FIGUUR 35: BOX-PLOT VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA153 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CA153 STALEN .....	57
FIGUUR 36: ROC-CURVE VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA153 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE.....	58
FIGUUR 37: BOX-PLOT VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA153 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CA153 STALEN .....	59
FIGUUR 38: ROC-CURVE VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN DE VERHOOGDE CA153 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	59
FIGUUR 39: BOX-PLOT VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN DE VERHOOGDE CA153 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CA153 STALEN .....	60
FIGUUR 40: OVERZICHT VAN DE VERSCHILLENDE ROC-CURVES VOOR DE VERHOOGDE CA153 STALEN .....	61
FIGUUR 41: ROC-CURVE VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE CA199 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	62
FIGUUR 42: BOX-PLOT VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE CA199 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CA199 STALEN.....	62

FIGUUR 43: ROC-CURVE VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA199 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	63
FIGUUR 44: BOX-PLOT VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA199 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CA199 STALEN .....	64
FIGUUR 45: ROC-CURVE VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA199 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE.....	64
FIGUUR 46: BOX-PLOT VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CA199 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CA199 STALEN .....	65
FIGUUR 47: ROC-CURVE VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN DE VERHOOGDE CA199 STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	66
FIGUUR 48 BOX-PLOT VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN DE VERHOOGDE CA199 STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CA199 STALEN .....	66
FIGUUR 49: OVERZICHT VAN DE VERSCHILLENDE ROC-CURVES VOOR DE VERHOOGDE CA199 STALEN.....	67
FIGUUR 50: ROC-CURVE VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE CEA STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	68
FIGUUR 51: BOX-PLOT VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE CEA STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CEA STALEN .....	68
FIGUUR 52: ROC-CURVE VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CEA STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	69
FIGUUR 53: BOX-PLOT VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CEA STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CEA STALEN.....	70
FIGUUR 54: ROC-CURVE VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CEA STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE.....	70
FIGUUR 55: BOX-PLOT VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE CEA STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CEA STALEN.....	71
FIGUUR 56: ROC-CURVE VAN VERSCHIL IN NAGALASE VAN DE VERHOOGDE CEA STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	72
FIGUUR 57: BOX-PLOT VAN VERSCHIL IN NAGALASE VAN DE VERHOOGDE CEA STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": CEA STALEN .....	73
FIGUUR 58: OVERZICHT VAN DE VERSCHILLENDE ROC-CURVES VOOR DE VERHOOGDE CEA STALEN .....	73
FIGUUR 59: ROC-CURVE VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE PSA STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	74
FIGUUR 60: BOX-PLOT VAN DE COMPLEXMETINGEN VAN DE VERHOOGDE PSA STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": PSA STALEN.....	75
FIGUUR 61: ROC-CURVE VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE PSA STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	75
FIGUUR 62: BOX-PLOT VAN DE VRIJE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE PSA STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": PSA STALEN.....	76
FIGUUR 63: ROC-CURVE VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE PSA STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	77
FIGUUR 64: BOX-PLOT VAN DE TOTALE NAGALASE-METINGEN VAN DE VERHOOGDE PSA STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": PSA STALEN.....	77

FIGUUR 65: ROC-CURVE VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN DE VERHOOGDE PSA STALEN. AUC = AREA UNDER CURVE .....	78
FIGUUR 66: BOX-PLOT VAN HET VERSCHIL IN NAGALASE VAN DE VERHOOGDE PSA STALEN. "CAT=0": GEZONDE STALEN, "CAT=1": PSA STALEN.....	78
FIGUUR 67: OVERZICHT VAN DE VERSCHILLENDE ROC-CURVES VOOR DE VERHOOGDE PSA STALEN .....	79
FIGUUR 68: COMPLEXRATIO'S EN CEA-WAARDEN IN FUNCTIE VAN DE TIJD. P10 IS HET 10 PERCENTIEL EN P90 IS HET 90 PERCENTIEL .....	81

## Verklarende woordenlijst

1,25-D	1,25-dihydroxyvitamine D3
25-D	25-hydroxyvitamine D3
$\alpha$ -GalNac	$\alpha$ -N-acetylgalactosamine
AUC	area under the curve
CA125	cancer antigen 125
CA153	cancer antigen 153
CA199	cancer antigen 199
CEA	carcinoembryogeen antigen
DBP	vitamine D-bindend proteïne
DBP-MAF	DBP-macrofaag activerende functie
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FA	fluorescence assay
nagalase	$\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase
PSA	prostaatspecifiek antigen
ROC	relative operating characteristic
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
WB	witte bloedcel(len)





## Abstract

Epsilon Biotech doet onderzoek naar nagalase en naar het vitamine-D-bindend proteïne (DBP), een precursor van de DBP-macropaagactiverende factor (DBP-MAF). Nagalase wordt tot overexpressie gebracht in tumorcellen van kankerpatiënten die in stadium III of hoger zitten. Dit enzym inactieveert DBP of kan een inactief complex vormen met DBP-MAF, wat in beide gevallen leidt tot immunosuppressie.

Het doel van dit onderzoek is een algemene kankermerker zoeken op basis van de complex- of nagalaseactiviteit in het bloed. Het complex wordt aangetoond met een sandwich ELISA. Door het toevoegen van ammoniumsulfaat dissocieert het complex in nagalase en DBP-MAF. De activiteit van nagalase vóór en na dissociatie wordt bepaald met een *fluorescence assay* en geeft respectievelijk de vrije en totale nagalase activiteit. Het verschil tussen deze nagalaseactiviteiten kan een maat zijn voor de complexvorming, die hoger wordt verwacht bij kankerpatiënten. Er wordt onderzocht of op basis van deze complex- en nagalaseactiviteitsmetingen een onderscheid gemaakt kan worden tussen gezonde en kankerpatiënten.

Uit de resultaten volgt dat de hoeveelheid van het complex bij de meeste kankerpatiënten echter lager is dan bij gezonde individuen. De totale nagalaseactiviteit daarentegen is hoger bij kankerpatiënten. Nagalase vormt dus niet enkel met DBP-MAF een complex maar ook met andere macromoleculen afkomstig van kankercellen. Het verschil in nagalase is hoger voor vier van de vijf gemeten kankers en kan een toekomstige kankermerker zijn.



## Abstract in English

Epsilon Biotech researches nagalase and the vitamin D binding protein (DBP) which is a precursor for the DBP macrophage activating factor (DBP-MAF) . Nagalase is overexpressed in tumor cells of cancer patients in stage III or higher. This enzyme inactivates DBP or will form an inactive complex with DBP-MAF, both lead to immunosuppression.

The goal of this research is to find a general tumor marker based on the complex or nagalase activities in blood samples. The complex is detected with a sandwich ELISA. By adding ammonium sulphate, the complex will dissociate in nagalase and DBP-MAF. The activity of nagalase before and after dissociation is determined with a fluorescence assay and respectively gives the free and total nagalase activity. The difference between these activities are a measure for the quantity of the complex, which is expected to be higher in cancer patients. These activity and complex measurements are tested to distinguish healthy individuals from cancer patients.

From the results follows that the complex in cancer patients is present in lower levels than in healthy individuals. The total activity of nagalase is however higher in cancer patients. So nagalase will not only form a complex with DBP-MAF but also with other cancer derived molecules like the tumor markers. The difference in nagalase is higher for four out of the five measured cancers and this could be a future tumor marker.



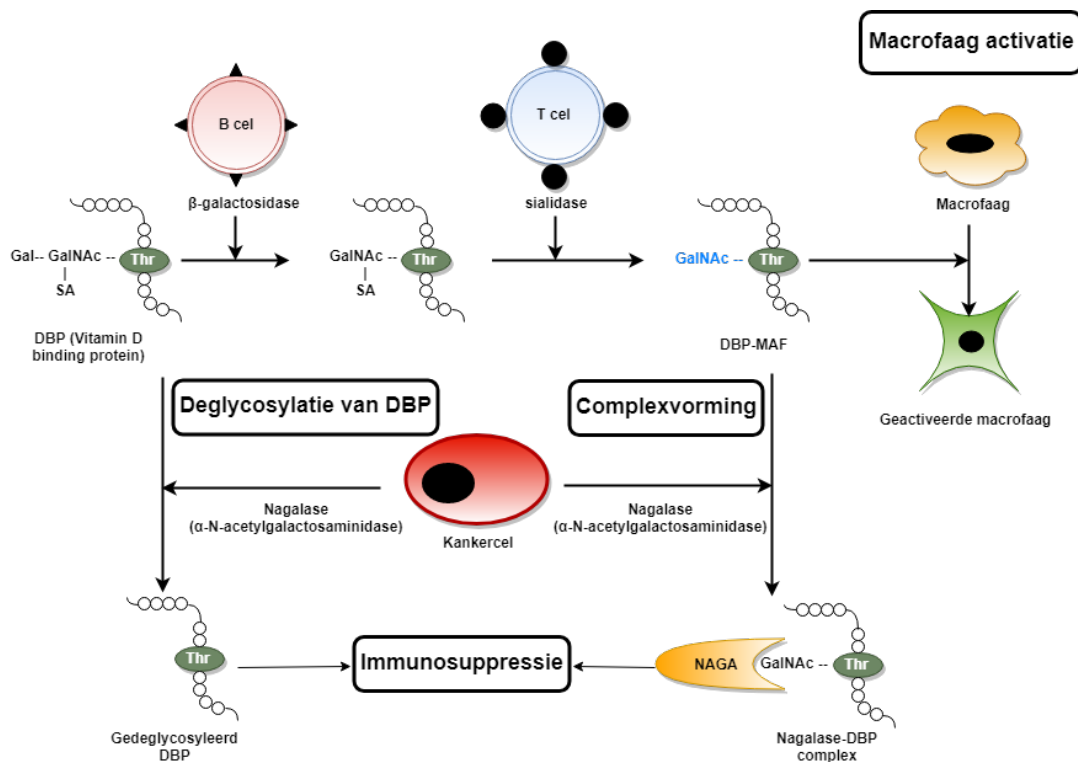
# 1 Inleiding

## 1.1 Situering

Epsilon Biotech is een kleinschalig bedrijf dat biochemische onderzoeken en testen uitvoert voor derden. In deze masterproef ligt de focus op het onderzoek naar het vitamine D-bindend proteïne (DBP) of Gc-globuline en nagalase, meer specifiek het complex dat gevormd wordt tussen DBP en nagalase. Dit proteïne heeft verschillende fysiologische functies zoals vitamine D-transport, *actine scavenging*, versterken van de chemotactische reactie van C5a bij een ontstekingsreactie en macrofaagactivatie [1].

Kanker is jaarlijks verantwoordelijk voor meer dan 8 miljoen sterftegevallen [2]. Kankers kunnen het immuunsysteem onderdrukken op verschillende manieren, waarvan een aantal zich richten tot de anti-tumor effectorcellen zoals macrofagen. Deze kunnen namelijk geactiveerd worden door het vitamine D bindend proteïne. Dit proteïne heeft drie suikergroepen of -restgroepen, namelijk siaalzuur, galactose en  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine ( $\alpha$ -GalNac). In een gezond persoon wordt het DBP omgezet naar een macrofaagactiverende factor (DBP-MAF) door de afsplitsing van twee van de drie suikergroepen [3]. Deze reacties worden gekatalyseerd door membraangebonden  $\beta$ -galactosidase op B-cellen en sialidase op T-cellen, die respectievelijk galactose en siaalzuur afsplitsen van het DBP wat resulteert in de vorming van DBP-MAF met de resterende suikergroep  $\alpha$ -GalNac. Dit proteïne kan macrofagen stimuleren door hun fagocytotische en tumorlytische activiteit, zoals het superoxidesysteem, te verhogen en dus de immuunreactie activeren [4].

Het enzym  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminase (nagalase) is een lysosomaal enzym dat in kleine hoeveelheden aanwezig is in een gezond persoon. Dit enzym splitst hoofdzakelijk het eindstandige  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine ( $\alpha$ -GalNac) af van glycoproteïnen.  $\alpha$ -GalNac is een O-gebonden suikerderivaat gebonden aan serine- en threonineresiduen. Deze deglycosylatiereactie is nodig bij de afbraak van glycolipiden [5]. Omdat nagalase deze reactie katalyseert bij DBP wordt  $\alpha$ -GalNac afgesplitst wat de precursoractiviteit van DBP inhibeert zoals afgebeeld in Figuur 1. In de literatuur wordt beweerd dat tumorcellen dit enzym tot overexpressie brengen, wat uiteindelijk zorgt voor een verlaagde concentratie DBP-MAF. Dit leidt tot een verminderde immuunreactie of immunosuppressie. Het is bewezen dat de enzymconcentratie rechtstreeks gerelateerd is aan de aanwezigheid van tumoren in het lichaam en dus ook aan de kanker [6]. Maar in voorgaand onderzoek bij Epsilon Biotech is gebleken dat de activiteit van nagalase lager ligt bij kankerpatiënten, wat de voorgaande onderzoeken dus tegenspreekt. Daarom is de hypothese gesteld dat nagalase niet alleen de deglycosylatiereactie met DBP zal katalyseren maar dat het ook een complex kan vormen met DBP-MAF. Dit verklaart de lagere activiteit van het enzym. Deze complexvorming zou dan op deze manier ook bijdragen aan de immunosuppressie door kankercellen.



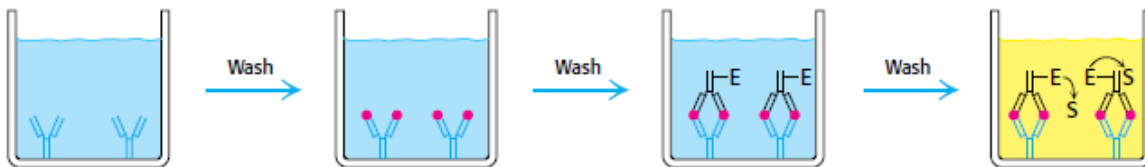
Figuur 1: Cascade van DBP tot DBP-MAF, de deglycosylatie van DBP en de vorming van het complex [7].

## 1.2 Probleemstelling

Nagalase kan een indicator zijn voor bepaalde kankers. Een hogere concentratie van het enzym in het bloed wijst namelijk op een overexpressie van nagalase door de kankercellen vanwege de immunosuppressiereactie. De activiteit van nagalase kan bepaald worden door een sandwich ELISA-test. Met deze test wordt de vrije nagalase-activiteit in het bloedserum bepaald. Als hypothese wordt er echter gesteld dat nagalase een complex vormt met DBP waardoor DBP de capaciteit verliest om DBP-MAF te vormen. Volgens *Redher et al.* blijkt namelijk dat er geen verhoogde deglycosylatie van DBP plaatsvindt bij kankerpatiënten ondanks de verhoogde nagalasehoeveelheid. Dit wil zeggen dat de inactivatie van DBP-MAF op een andere manier verklaard moet worden [8]. Een mogelijke verklaring hiervoor is dus de vorming van het nagalase-DBP-MAF-complex aangezien dit niet leidt tot een deglycosylatie maar wel tot een gebonden, niet-buikbaar DBP-MAF. De ELISA-test voor nagalase meet dus niet de concentratie van het enzym in dit complex, enkel de vrije nagalasehoeveelheid in het serum.

Daarom is het nodig om een nieuwe sandwich-ELISA voor dit complex te ontwerpen door de bestaande ELISA's voor nagalase en DBP te combineren (Figuur 2). Er zijn twee specifieke antilichamen nodig die elk aan één van de macromoleculen (nagalase en DBP-MAF) binden. Zo wordt het antilichaam voor nagalase gebruikt als een capture Ab om het complex te fixeren op de plaat. Het antilichaam voor DBP-MAF is dan het detectie antilichaam voor deze test wat zorgt voor een meetsignaal. Maar hierbij kunnen nog een aantal problemen opduiken. De vorming van het complex is voorlopig slechts een hypothese en moet nog aangetoond worden. Het is dus niet geweten of de complexvorming leidt tot een conformatieverandering van DBP-MAF of nagalase. Indien dit het geval zou zijn, dan is er een kans dat de antilichamen niet

meer kunnen binden aan het proteïne of enzym. Hetzelfde probleem treedt op wanneer de antilichamen binden op de actieve site van het enzym. Door de binding van het substraat op de actieve site van het enzym zal er namelijk geen mogelijkheid zijn voor de antilichamen om hier aan te binden. Daarbovenop moeten de juiste verdunningen van het serum, enzym en substraten bepaald worden waarbij deze ELISA moet uitgevoerd worden. Momenteel is er ook nog geen protocol om de standaardcurve op te stellen aangezien er geen standaard met gekende concentratie aan complex voorhanden is.



*Figuur 2: Het principe van sandwich ELISA [9]*

Indien deze ELISA het complex aantoon, moet het resultaat nog gevalideerd kunnen worden door een andere test. Er wordt dus gezocht naar een alternatieve methode om dit complex aan te tonen en te kwantificeren.

Dit complex kan mogelijk dienen als algemene tumormarker aangezien de concentratie van het complex hoger zal zijn in kankerpatiënten. Voorlopig kan in het bloed kanker opgespoord worden aan de hand van bepaalde tumormerkers. Deze merkers zijn specifiek voor een bepaalde kanker. Zo kan enkel één soort kanker per test onderzocht worden. Voor de screening naar kanker moeten dus meerder merkers gelijk getest worden de kostprijs van het onderzoek doet stijgen. Daarom is het interessant om een algemene tumormarker te vinden die belangrijk zal zijn in kankerscreening.

### 1.3 Doelstellingen

Het doel van dit project is een ELISA-test te ontwikkelen om het complex tussen nagalase en DBP aan te tonen en te kwantificeren. Vervolgens wordt deze ELISA getest op gezonde stalen en kankerstalen om aan te tonen of er een verschil is in concentratie van het complex. Ook zullen de stalen getest worden op vrije en totale nagalase-activiteit.

Om de ELISA-test op te stellen voor het complex wordt er uitgegaan van de protocollen van de ELISA voor enerzijds nagalase en anderzijds DBP. Hierbij wordt dus het antilichaam voor nagalase gebruikt als een capture Ab en het antilichaam voor DBP wordt gebruikt als een detectielichaam. De protocollen van beide tests worden samengelegd en gecombineerd om zo een algemeen protocol voor deze nieuwe test te schrijven.

De volgende doelstelling is het testen van dit protocol op serumstalen van een pool om te bepalen of met deze test het complex aangetoond kan worden. Eerst wordt gezocht naar bruikbare serumverdunningen voor deze ELISA-test. Als het complex aangetoond wordt, moet de test verder geoptimaliseerd worden om een beter signaal te krijgen.



Wanneer een positief resultaat bekomen wordt bij de ontwikkelde test, moet het resultaat nog gevalideerd worden met een alternatieve test. Er moet dus een validatietest gevonden worden welke ook de aan-of afwezigheid van dit complex aantoont.

De laatste doelstelling van dit project is het uitschrijven van een uitgebreid rapport waarin alle resultaten besproken worden en de gemaakte keuzes verduidelijkt worden.

#### 1.4 Methode

Eerst worden de protocollen van beide ELISA-testen van DBP en nagalase bestudeerd om uiteindelijk deze te combineren en hiervan uiteindelijk één sandwich ELISA-test (Figuur 2) van te maken die toepasbaar wordt op het nagalase-DBP complex. Het capture antilichaam is afkomstig van de nagalase ELISA-test. Om dit antilichaam te coaten op de platen, wordt het protocol van nagalase ELISA gebruikt. Als het nagalase antilichaam gebonden is en het serum toegevoegd wordt, wordt er een substraat, nl. 4-methylumbelliferyl-alpha-N-acetyl-D-galactosaminide toegevoegd om de vrije nagalasehoeveelheid te bepalen met behulp van fluorescentie. Hierna wordt het detectie antilichaam, nl. anti-Gc globuline opgekweekt in konijnen, toegevoegd dat bindt op het DBP- gedeelte van het complex. Aan dit antilichaam hangt dan een ander signaalmolecule, nl. horseradish peroxidase (HRP) dat de reactie katalyseert van het substraat TMB dat toegevoegd wordt. Zodra dit protocol uitgeschreven is, wordt het getest en waar mogelijk geoptimaliseerd. Bij optimalisatie wordt vooral gekeken naar de concentratie van de serumeiwitten en dus naar verdunning van het serum, maar ook van de antilichamen en substraten. Zo wordt in de eerste experimenten de gewenste verdunning van het serum bepaald door een verdunningsreeks te maken en die te testen op een gewenst signaal. Er wordt ook een standaardcurve geconstrueerd. Dit gebeurt met behulp van DBP in het plasma van een serumpool, waarin de concentratie overeen komt met deze van de literatuur, nl. 700 µg/ml [10].

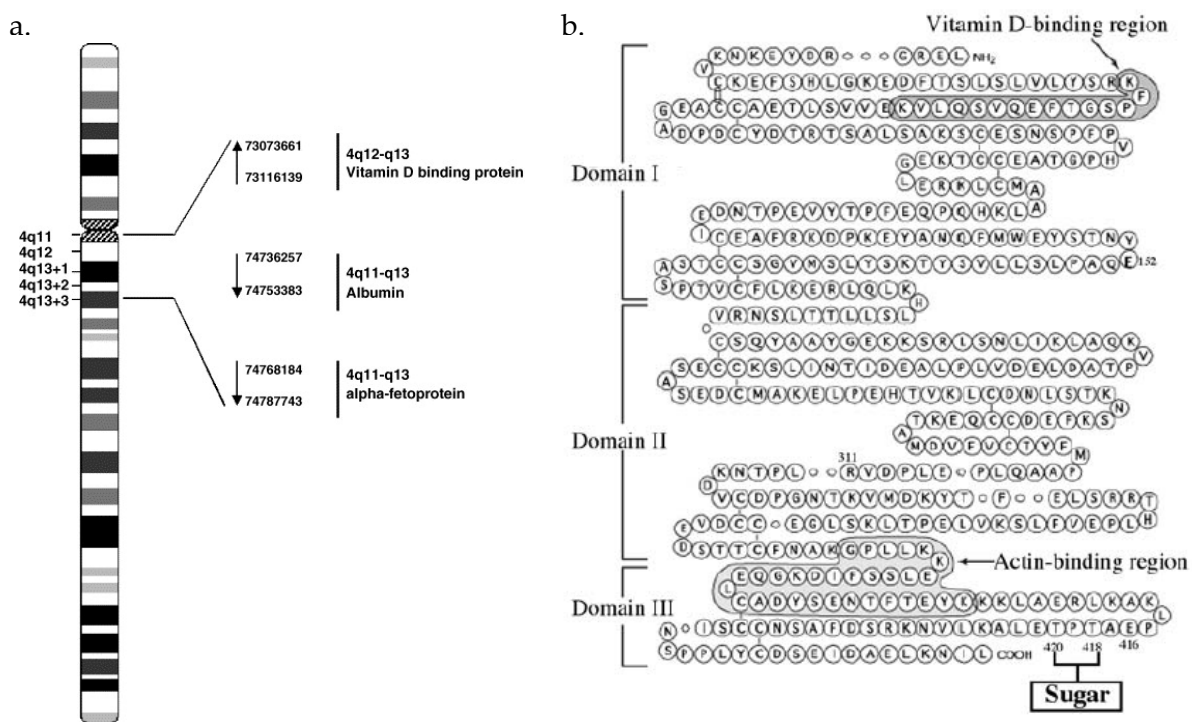
Indien deze ELISA positieve resultaten geeft voor het complex, kan na de optimalisatie getest worden met verschillende stalen van gezonde en kankerpatiënten. Er kan dan nagegaan worden of er een significant verschil is tussen beide stalen.

Verder zal ook de vrije en totale nagalase-activiteit getest worden in de stalen. Dit zal gebeuren met een *fluorescence assay* waarbij een substraat wordt toegevoegd dat door nagalase omgezet wordt tot een fluorescente stof. De fluorescentie wordt vervolgens gemeten. De totale nagalase is de vrije nagalase samen met de nagalase die gebonden zit aan het complex. Om het complex te doen dissociëren zal ammoniumsulfaat toegevoegd worden. Zo kan de totale nagalase-activiteit gemeten worden aan de hand van de *fluorescence assay*.

## 2 Vitamine D bindend proteïne

### 2.1 Structuur

Het vitamine D bindend proteïne (DBP) is een  $\alpha$ -globuline met een moleculair gewicht van 52-59 kDa. Oorspronkelijk kreeg het de naam Gc-globuline, waarbij Gc stond voor “group-specific component”, maar later werd ontdekt dat dit proteïne vooral vitamine D transporteert [11]. Structureel is het gerelateerd aan albumine en  $\alpha$ -foetoproteïne en behoort het ook bij deze genenfamilie [12]. Dit multifunctioneel glycoproteïne wordt gecodeerd door het Gc-gen, wat ligt op chromosoom 4, meer specifiek op 4q12-q13 zoals afgebeeld in Figuur 3a [13]. De aminozuursequentie van DBP bestaat uit 458 aminozuren gecodeerd door een genensequentie van 1690 nucleotiden opgedeeld in 3 domeinen [11]. Deze domeinen bestaan volledig uit  $\alpha$ -helices, 10 in domein I, 9 in domein II en 4 in domein III (Figuur 3b). Het bindingsdomein voor vitamine D ligt aan het N-terminaal gedeelte van domein I [14]. Het proteïne is gebonden aan een trisacharideketen met galactose, siaalzuur en N-acetylgalactosamine op de threonine eenheid op plaats 420. Dit glyco-gedeelte is belangrijk voor de omzetting naar DBP-MAF [15].

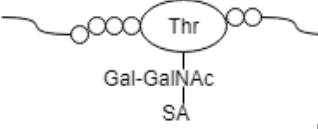
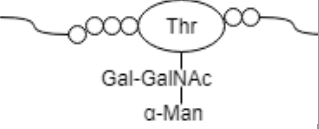
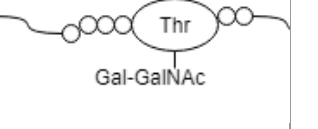


Figuur 3: a. Plaats van het gen coderend voor het vitamine D bindend proteïne op chromosoom 4 (4q12-q13) [57] b. De aminozuursequentie van het vitamine D-bindend proteïne met de 3 domeinen. [7]

Er zijn 3 verschillende vormen van DBP gebaseerd op de verschillende aminozuren op plaatsen 432 en 436, namelijk DBP-1S, DBP-1F en DBP-2. In het genotype is er 1 verschil in baseparen tussen DBP-1S en DBP-1F en 6 verschillen tussen DBP-2 en DBP-1S. DBP-1S heeft een glutaminezuur op positie 432 terwijl DBP-1F en DBP-2 een asparaginezuur hebben op die positie. DBP-2 heeft een lysineresidu op positie 436, waar DBP-1S en -1F een threonine hebben [16]. Er zijn 3 belangrijke suikerstructuren in de menselijke DBP-proteïnen. DBP-1F bevat een vertakt trisacharide met N-acetylgalactosamine dat gebonden is aan het threonine, een galactose eenheid en een siaalzuur. In DBP-1S bevat het trisacharide mannose in plaats van

siaalzuur. DBP-2 heeft een simpel glycosylatiepatroon met een centraal GalNAc gebonden aan een galactose-eenheid (Tabel 1).

Tabel 1: Verschillende fenotypes van het vitamine D bindend proteïne en hun verschillen in structuur. (Gal = galactose; GalNAc = N-acetylgalactosamine; SA = siaalzuur;  $\alpha$ -Man =  $\alpha$ -mannose) [7]

DBP Type	DBP-1F	DBP-1S	DBP-2
Plaats	418 of 420	418 of 420	418
Oligosacharide			

De *proteinturnover* of halfwaardetijd is slechts enkele dagen (1,7 dagen) en daarom zal in een gezond persoon de dagelijkse productie van DBP hoog zijn, namelijk gemiddeld 10 mg/kg lichaamsgewicht. De plasmaconcentratie van een gezond persoon is 300-600  $\mu$ g/ml [17]. DBP volgt een specifiek concentratiepatroon waarbij er afname is in de ochtend en een snelle stijging tot een plateau gedurende de dag. Dit dagelijkse ritme van DBP correleert met de 1,25-dihydroxyvitamine D- en albumineconcentratie [18].

## 2.2 Functies

De belangrijkste functie van DBP is het binden en transporteren van vitamine D. Het proteïne heeft ook nog andere functies zoals actine scavenging, chemotaxis en osteoclast en macrofaag activatie.

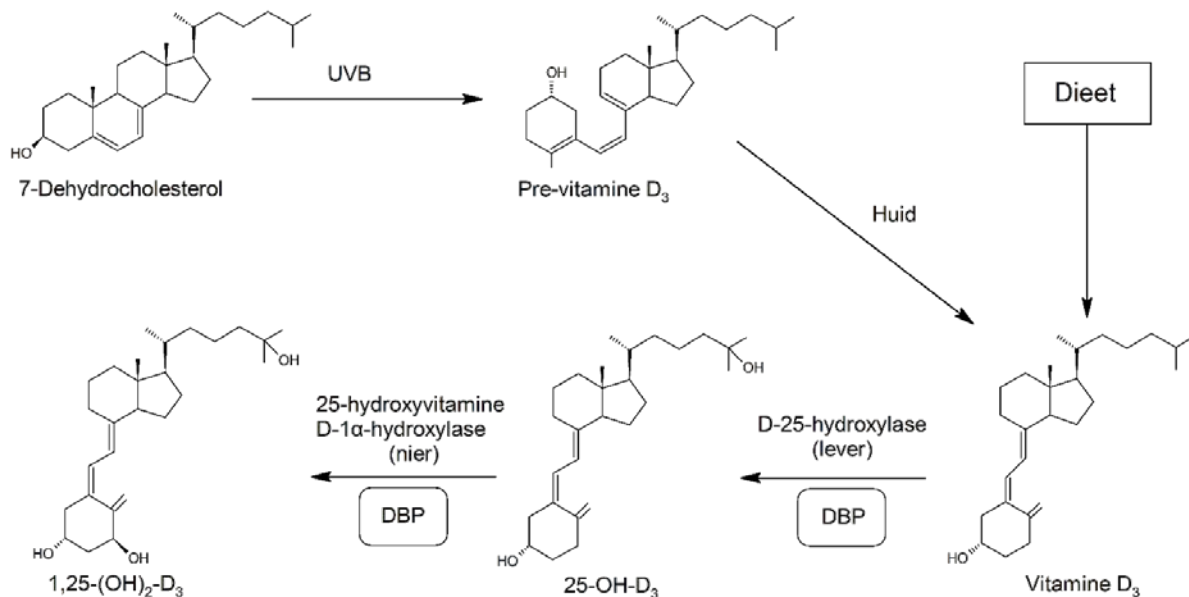
### 2.2.1 Vitamine D transport

#### 2.2.1.1 Vitamine D

Vitamine D verwijst naar een familie van stoffen afgeleid van de cyclopentanoperhydrofenanthreen ringsysteem wat vaak voorkomt in andere steroïden zoals cholesterol. In vergelijking met cholesterol heeft vitamine D slechts 3 intacte ringen zoals te zien in Figuur 4. Eén ring onderging een splitsing van de 9,10 C-binding wat resulteert in een geconjugeerd trieensysteem dat in alle vitamine D derivaten is terug te vinden. De verschillen tussen deze derivaten zijn veroorzaakt door de aard van de zijketens [19].

Vitamine D is een bioregulatorisch vitamine. De grootste bronnen van vitamine D zijn via het dieet, supplementen en blootstelling aan de zon. Het komt voor in 2 vormen, namelijk vitamine D<sub>2</sub> of ergocalciferol en vitamine D<sub>3</sub> of cholecalciferol. Ergocalciferol wordt teruggevonden worden in planten en wordt dus alleen opgenomen via het dieet of supplementen. UVB-straling zet 7-dehydrocholesterol (aanwezig in de huid) om tot pre-vitamine D<sub>3</sub> wat verder wordt omgezet tot vitamine D<sub>3</sub> punt. Het endogeen en het opgenomen vitamine D<sub>3</sub> worden vervolgens omgezet naar het biologisch inactieve prehormoon 25-(OH) vitamine D (25-D) of calcidiol door het enzym vitamine D-25-hydroxylase (CYP2R1) in de lever. Deze 25-D is de meest voorkomende vorm van vitamine D. Enkel na de omzetting tot het hormoon 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamine D (1,25-D) of calcitriol door het enzym 25-(OH) vitamine D-1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) in de nieren, kan het de vitamine D receptor activeren in de

celkern. Het is een calcium regulerend hormoon dat aan de receptoren van de epitheelcellen van de dunne darmcellen bindt om zo de efficiëntie van de calcium- en fosfaatopname te verhogen voor het onderhoud van het skelet [20], [21], [22].



Figuur 4: Het metabolisme van vitamine D [23].

#### 2.2.1.2 Functie vitamine D

Vitamine D is grotendeels biologisch inert, het moet dus eerst omgezet worden in actieve metabolieten. 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> is het meest actieve metaboliet. De voornaamste functie van dit metaboliet is de regulatie en homeostase van calcium en fosfor. Belangrijk hierin zijn de actieve adsorptie van Ca<sup>2+</sup> in de dunne darm en de toename van de mineralisatie van het bot. Dit gebeurt via 2 grote signaaltransductie pathways nl. genomisch en via membraanreceptorbinding. Zo wordt het geproduceerd in de lever en/of nieren als gevolg van een fysiologische stimulus. Vervolgens circuleert het in het bloed gebonden aan DBP tot aan de target weefsels waar het ligand bindt met de receptoren. Dit complex geeft een signaal waarbij de genexpressie gemoduleerd wordt of waarbij een bepaalde stof gesecreteerd wordt (Figuur 5a) [24].

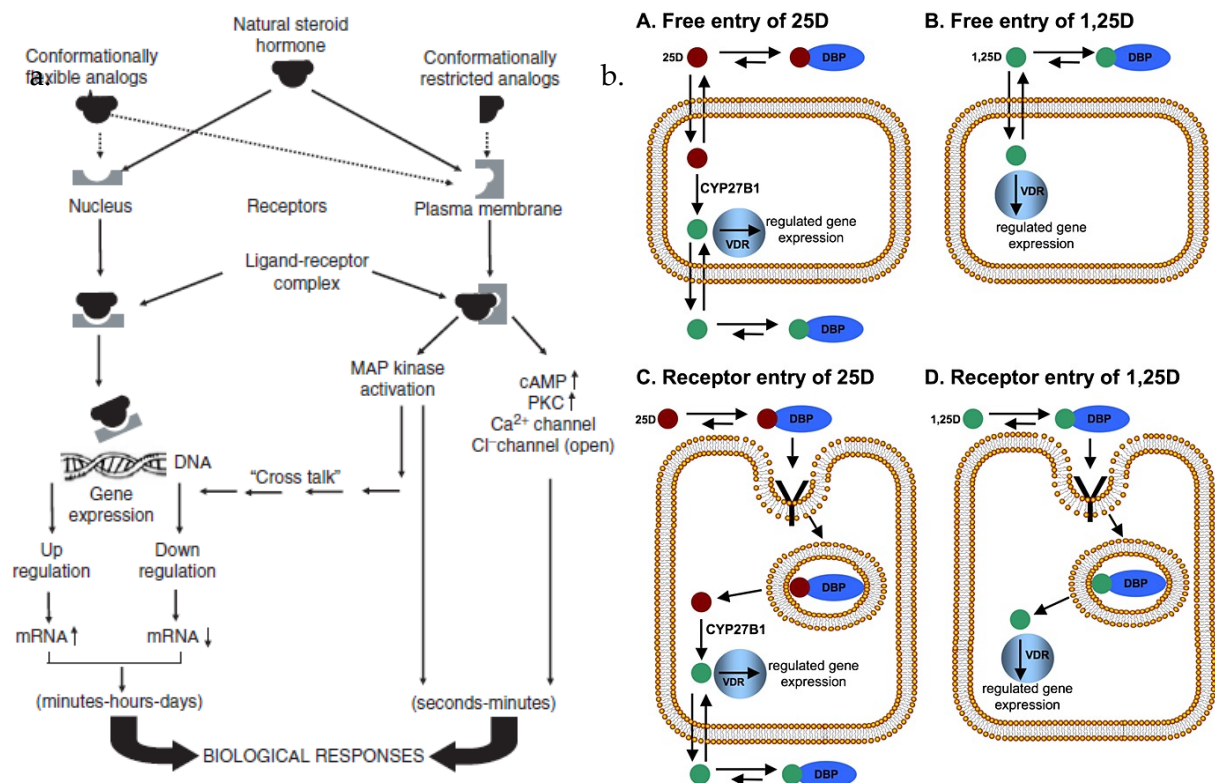
#### 2.2.1.3 Transport

Vitamine D en zijn metabolieten functioneren in verschillende weefsels dus het transport ervan is noodzakelijk in het hele lichaam [25]. Dit zal dan ook de belangrijkste functie zijn van het vitamine D bindend proteïne. Elk DBP-vitamine D metaboliet complex heeft zijn eigen affiniteitsconstante. 25-D bindt aan DBP met een hoge affiniteit ( $K_{DBP} = 5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $K_{DBP}$  is de affiniteitsconstante tussen DBP en vitamine D derivaten); terwijl 1,25-D het meest actieve metaboliet van vitamine D is gebonden met een lagere affiniteit ( $K_{DBP} = 4 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) [11]. In tegenstelling tot andere hydrofobe hormonen-carrier proteïnen in het menselijk plasma, heeft DBP een hoge concentratie in verhouding met zijn belangrijkste ligand 25-D en een karakteristieke hoge turnover snelheid.

Bij gezonde individuen is minder dan 5% van de bindingsplaatsen op DBP bezet door vitamine D steroïden [26]. De grote overmaat aan DBP kan een belangrijke rol spelen in de bescherming tegen vitamine D vergiftiging. Een overmaat aan vitamine D kan leiden tot hypercalcemie, een

calciumovermaat in het bloed. Daarom kan DBP dienen als buffer voor de toenemende concentratie vrije vitamine D metabolieten of als circulerend reservoir van 25-D [11]. Bij verhoogde concentraties zal vitamine D dus binden aan DBP zodat er minder vrij vitamine D in het bloed aanwezig is. Het wordt vervolgens getransporteerd naar de lever waar het omgezet wordt in verschillende vitamine D derivaten.

Onder normale fysiologische omstandigheden zijn bijna alle circulerende vitamine D componenten gebonden aan een proteïne wat een grote invloed heeft op de vitamine D kinetiek. De vrije hormonen hypothese verklaart de manier waarop de transportproteïnen in het bloed de liganden, de hormonen in dit geval, brengt naar de cellen. De vrije liganden kunnen dan door het celmembraan diffunderen. Zo komen 25-D en 1,25-D de cel binnen. 25-D kan echter ook omgezet worden door 1-hydroxylase in de cel waarbij 1,25D gesynthetiseerd wordt en terug vrijgesteld kan worden in de bloedcirculatie. Vitamine D kan ook gebonden aan DBP de cel binnen komen via receptor-gemedieerde opname. De sterkte van de binding en de evenwichtsconcentraties bepalen de concentratie aan vrije hormonen [27].



Figuur 5: a. De werking van een steroïde hormoon als signaalmolecule gebeurt op 2 manieren: genomisch en via receptorbinding. [55]. b. Transport en migratie van vitamine D naar de cel. A) Vrij migratie van 25D naar de cel. B) Vrije migratie van 1,25D naar de cel. C) Migratie van 25D gebonden aan DBP via receptor D) Migratie van 1,25D gebonden aan DBP via receptor [56].

In gezonde vrouwen correleert de concentratie aan 1,25-D in het serum met deze van het DBP [28]. Zwangerschap en oestrogeen behandeling verhoogt significant de concentratie DBP in het serum met gelijktijdige toename van totale 1,25-D concentratie. De vrije 1,25-D fractie, de biologische actieve vorm, blijft onveranderd [29].

### 2.2.2 Actine scavenging

Actine is een intracellulair proteïne dat aanwezig is in alle eukaryotische cellen en heeft verschillende functies zoals in spiercontractie, celbeweging en behoud van celvorm en -

structuur. Er zijn 2 vormen van actine, nl. F-actine (filamenteus) en G-actine (bolvormig). Bij ernstige cellulaire schade zoals trauma komen er grote hoeveelheden actine in het bloed terecht in de vorm van F-actine. Deze actinefilamenten doen de bloedviscositeit doen toenemen wat fatale gevolgen kan hebben zoals bloedklontering en orgaandysfunctie. DBP zal hierbij aan het vrij actine binden met een hoge affiniteit ( $K = 1 \times 10^{-9}$ ) en het verwijderen uit de bloedbaan, waardoor actinepolymerisatie wordt verhinderd [30]. Bijgevolg daalt de concentratie aan vrije DBP in het bloed dalen. De DBP-actine complexen worden uiteindelijk door de lever opgenomen en uit de bloedbaan gehaald.

### 2.2.3 Vetzuurtransport

Een derde belangrijke functie van DBP is de binding van mono-onverzadigde en verzadigde vetzuren. Aangezien albumine in grote concentraties aanwezig is in het bloed en een grote affiniteit heeft voor vetzuren, is dit de belangrijkste transporter van vetzuren. Maar bij een tekort aan albumine kan ook DBP optreden als een vetzuurtransporter door te binden met mono-onverzadigde en verzadigde vetzuren [31]. Minder dan 5% van de totale hoeveelheid vetzuren, gebonden aan DBP, is aanwezig in poly-onverzadigde vorm [32]. De affiniteit van 25-D en 1,25-D voor DBP neemt af in aanwezigheid van mono en poly-onverzadigde vetzuren, maar blijft gelijk met verzadigde vetzuren. Er worden sterke complexen gevormd tussen DBP en vetzuren zoals arachidonzuur en palmitinezuur met bindingsconstanten van respectievelijk  $6 \times 10^{-5}$  en  $7 \times 10^{-5}$  M. Deze vetzuren induceren een conformatieverandering van DBP zodat binding met vitamine D derivaten niet mogelijk is [33].

### 2.2.4 Chemotaxis

DBP versterkt de chemotactische activiteit van C5-afgeleide peptides (C5a en C5a<sup>desArg</sup>) op humane neutrofielen, monocytten en fibroblasten [34]. Chemotactische en effectorfuncties van neutrofielen worden gecontroleerd door verschillende mediators (zoals cytokines en eicosanoiden) waarvan het complement-afgeleide C5a een van de meest sterke is in de ontstekingsreactie. C5a beoefent meerdere effecten uit op de target cellen, waaronder chemotaxis, degranulatie, oxidatieve burst, celadhesie veranderingen, vasoconstrictie, verhoogde vasculaire permeabiliteit en gladde spiercontractie [35]. De lokale hoeveelheid mediators bepaalt de individuele respons van elke neutrofiële cel. DBP kan in deze omgeving selectief de chemotactische eigenschappen van C5a en C5a<sup>desArg</sup> promoten. De binding van C5a zal de C5a-receptoren niet gaan reguleren, zoals normaal gebeurt in cytokine-gestuurde leukocyt chemotaxis, maar het zal binden aan CD44 membraanreceptoren op een cel. Samen met annexine A2 versterkt dit complex dan de effecten van C5a en C5a<sup>desArg</sup>. DBP is dus een belangrijke cofactor [36].

### 2.2.5 Rol in het immuunsysteem

Als een deel van de ontstekingsreactie kan DBP gedeglycolyseerd worden door T- en B-cel glycosidasen tot Gc-MAF of DBP-MAF. Dit is een macromolecule met diverse en kritische fysiologische functies. De overblijvende suikerrest GalNAc is nodig om het fagocytotisch vermogen en tumordodende activiteit van macrofagen te doen toenemen door het vormen van superoxides. Ook heeft het DBP-MAF een anti-angiogenese activiteit dankzij de activatie van macrofagen, wat bijgevolg tegen tumoren gebruikt kan worden als behandeling. [37] Dit wordt verder besproken, zie paragraaf 2.3.

## 2.3 DBP-macrofaag activerende factor (DBP-MAF)

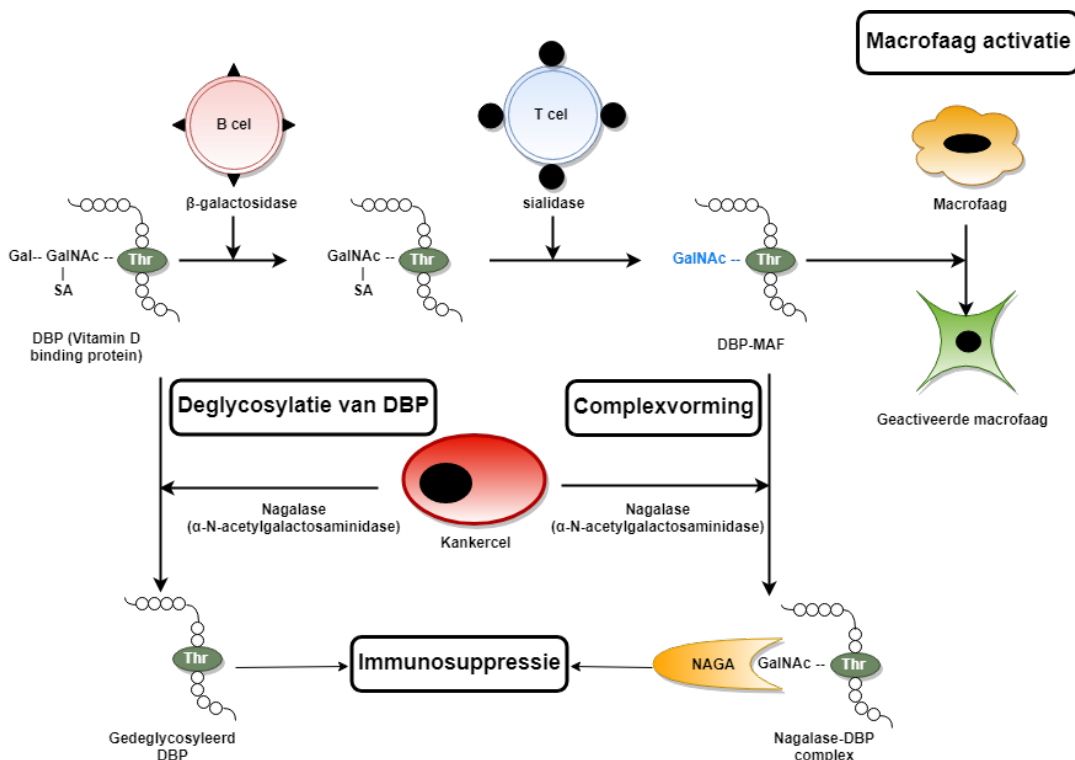
### 2.3.1 Vorming

DBP-macrofaag activerende factor is een gedeglycolyseerde vorm van het DBP waarbij de galactose- en siaalzuureenheden afgesplitst worden (Figuur 6). Eerst wordt de galactose-eenheid verwijderd door een membraangebonden  $\beta$ -galactosidase van een B-cel. Hierna gebeurt de verwijdering van siaalzuur door het membraangebonden sialidase op T-cellen waarbij enkel een N-acetylgalactosamine (GalNAc) overblijft op het threonine residu op plaats 420. Deze glycosidasen worden tot expressie gebracht door de immuuncellen als ontstekingsreactie.

### 2.3.2 Functies

#### 2.3.2.1 Immunreactie

De ontstekingsreactie is een complexe weefselreactie op een fysiek letsel, op een infectie of op een lokaal immuunrespons gekarakteriseerd door de verandering van de lokale vascularisatie, ophoping van vocht, biologisch actieve proteïnen en witte bloedcellen. De ontwikkeling van lokale en systemische ontsteking is complex gelinkt aan deze vasculaire en cellulaire responsen. Een van deze cellulaire responsen is het tot expressie brengen van glycosidasen van de immuuncellen. Deze enzymen zetten het DBP vervolgens om naar het actieve DBP-MAF. Dit start de immunreactie door de macrofagen te activeren omdat hun fagocytische en tumorlytische activiteit verhogen door onder andere superoxides te vormen [15].



Figuur 6: Cascade van DBP tot DBP-MAF, de deglycosylatie van DBP en de vorming van het complex [7].

#### 2.3.2.2 Inhibitie van angiogenese

Angiogenese is een factor die de progressie van kankers versterkt door nieuwe bloedvaten te vormen rond de tumorcellen zodat deze sneller groeien [38]. Tijdens tumorangiogenese vermenigvuldigen endotheelcellen zich, migreren ze en vormen ze nieuwe vaten. Hoewel macrofagen die geactiveerd worden door DBP-MAF tumordodend zijn, werd verondersteld



dat DBP-MAF rechtstreeks een antiangiogenische activiteit heeft. Dit werd getest op fibroblasten groeifactor 2 wat de neovascularisatie stimuleert. Uit onderzoek bleek dat DBP-MAF deze stof en dus ook de angiogenese inhibeert. Deze antiangiogenische effecten worden bemiddeld door de CD36 receptor. Dit is een receptor die op verschillende cellen voorkomt en bindt met een antiangiogenese factor. [39] Andere studies hebben verder bewezen dat DBP-MAF angiogenese blokkeert door kritische stappen te blokkeren zoals proliferatie en migratie van endotheelcellen, vaatvorming en-ontwikkeling [40].

#### 2.3.2.3 *Osteoclasten activatie*

DBP-MAF kan de osteoclastenactiviteit en botresorptie stimuleren. Defecten in botresorptie kan leiden tot osteopetrose, wat leidt tot dichte en brosse botstructuren [41]. Er wordt verondersteld dat de suikerzijketen van DBP-MAF cruciaal is in dit proces. DBP-MAF afkomstig van het baculovirus behoudt de osteoclast-stimulerende activiteit, terwijl niet-gedeglycolyseerde DBP uit *E. coli* geen activiteit vertoont. Bij de werking van DBP-MAF is een cellulaire feedbackloop betrokken die de activiteit van de osteoclasten doet afnemen zodra de extracellulaire calciumconcentraties toenemen [42]. Er wordt verondersteld dat DBP-MAF deze feedbackloop inhibeert en zo de osteoclasten activiteit behoudt in aanwezigheid van extracellulair calcium. In geval van ontsteking zal de DBP-MAF vorming gestimuleerd worden wat kan bijdragen aan de botresorptie door zijn effect in de calciumregulatie van osteoclasten [43].



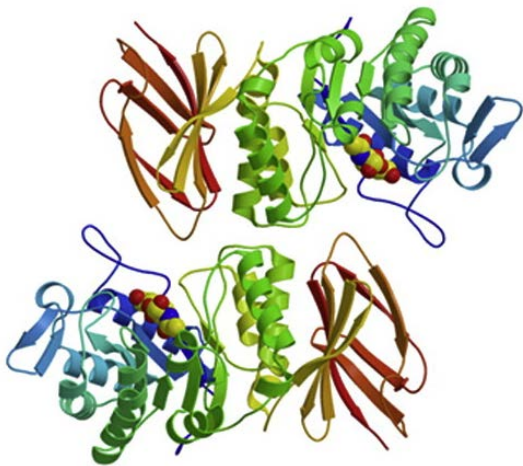


### 3 $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase

$\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase (EC 3.2.1.49) of nagalase is een lysosomaal enzym dat hoofdzakelijk geproduceerd wordt in de lever. Het wordt gecodeerd door een gen gelokaliseerd op chromosoom 22q13 [44].

#### 3.1 Structuur

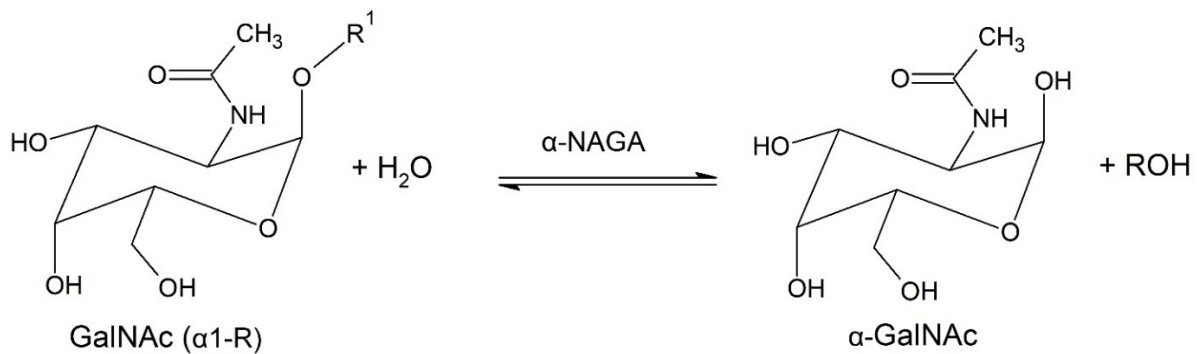
Menselijk nagalase is een homodimeer waarbij elk monomeer 394 residuen bevat dat verdeeld is in 2 domeinen. Domein 1 vormt een  $(\beta/\alpha)_8$  vat en domein 2 bevat 8 antiparallelle  $\beta$  strengen met 2  $\beta$  bladen (Figuur 7). De actieve site kan gevonden worden aan de C-einde van de  $\beta$  strengen in het eerste domein en wordt gevormd door loops aan de 6 opeenvolgende  $\beta$  strengen,  $\beta_1 - \beta_6$ .



*Figuur 7: Lintdiagrammen van nagalase (bekeken langs 2 kanten) bestaande uit 2 domeinen: het eerste domein bestaat uit een  $(\beta/\alpha)_8$  vat en het tweede domein bestaat uit 8 antiparallelle  $\beta$  strengen [45].*

#### 3.2 Functie

Nagalase splitst hoofdzakelijk de eindstandige  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine of  $\alpha$ -GalNac af van glycolipiden en glycoproteïnen, namelijk de O-gebonden suikers aan serine en threonine residuen. Deze reactie is nodig bij de afbraak van glycolipiden en glycoproteïnen. Het opereert met een pingpong reactie mechanisme waarbij het  $\alpha$ -anomere substraat gesplitst wordt door 2 nucleofiele aanvallen op de anomere koolstof [45]. Oorspronkelijk had het de naam  $\alpha$ -galactosidase B vanwege zijn bijkomende reactiviteit op substraten met terminale  $\alpha$ -galactose sachariden-eenheden. Bij de mens komt nagalase enkel voor in zijn exo-hydrolasevorm. Bij andere organismen komt het ook voor in de endo vorm. Nagalase splitst N-acetylgalactosamine af van het DBP, waardoor DBP zijn precursoractiviteit voor DBP-MAF verliest (Figuur 8). Bij een overexpressie, zoals bij kankercellen zal er dus een tekort aan DBP-MAF zijn met immunosuppressie als gevolg.



*Figuur 8: Reactie van nagalase waarbij α-N-acetylgalactose of α-GalNAc afgesplitst wordt van een glycolipide of glycoproteïne (R<sup>1</sup> is het proteïne deel) [45].*

Nagalase is pH-afhankelijk, namelijk de activiteit neemt af met toenemende pH. Uit *Mohamad et al.* volgt dat de optimale pH voor nagalase 5 is. Hoe minder zuur de matrix is waarin het zich bevindt is, hoe lager de activiteit zal zijn. Hierbij bleek dat nagalase afkomstig van levercellen geen activiteit meer vertoonden bij pH 7, dit in tegenstelling tot de tumorcellen waar wel nog activiteit was. Hierbij bleek dat in een gezond individu geen activiteit meer was bij pH 7 [46].

### 3.3 Ziektes

#### 3.3.1 Kanker

Kankerpatiënten die in stadium III of hoger zitten, hebben een verhoogde nagalase-activiteit in het serum. Deze activiteit daalt indien de tumor verwijderd wordt, wat betekent dat de activiteit van de nagalase beïnvloedt wordt door de tumor. Patiënten in stadium I of II bezitten dezelfde nagalase-activiteit en dus nagalase-hoeveelheid als gezonde personen, dus het kan geen merker zijn om in vroege stadia kanker op te sporen [47]. Zoals hierboven vermeld is het enzym pH-afhankelijk, met een optimale pH van 5 en geen activiteit meer op pH 7. Kankerpatiënten daarentegen hadden wel nog nagalase-activiteit bij pH 7. Dit resultaat suggereert dat de nagalase-activiteit bij kankerpatiënten verschillend is dan deze van gezonde individuen [46].

#### 3.3.2 Ziekte van Schindler

De ziekte van Schindler is een zeldzame autosomale recessieve aandoening, vooral voorkomend bij kinderen van bloedverwante ouders. Het wordt gekenmerkt door een verminderde activiteit van nagalase door een mutatie in het gen van het enzym. Het verlies van functioneel nagalase leidt ook tot een lysosomale ophoping van glycoproteïnen en glycolipiden, wat uiteindelijk resulteert in neurologische symptomen. In de meest ernstige vormen zal het kind een ontwikkelingsachterstand hebben met een vegetatieve toestand als resultaat.

## 4 Tumormerkers

Tumor merkers zijn stoffen, meestal proteïnen geproduceerd door het lichaam als reactie op tumorgroei of door het tumorweefsel zelf. Het meten of identificeren van deze merkers is nuttig in de diagnose en opvolging van de patiënt. Een ideale tumormerker is zeer gevoelig, specifiek, nauwkeurig, betrouwbaar en makkelijk analyseerbaar. Maar geen enkele tumormerker heeft al deze eigenschappen. Maar tumormerkers zijn ondanks hun beperkingen belangrijke middelen om een gezonde individuen en hoge risicogroepen te screenen op bepaalde kankers, om een diagnose en prognose te stellen voor een specifieke kanker en om het verloop van de ziekte op te volgen [48].

Er zijn dus verschillende merkers voor verschillende kankers. In Tabel 1 is een overzicht gegeven van de belangrijkste tumormerkers en de kanker die getest wordt met deze merker. CA125 is *cancer antigen 125* dat gebruikt wordt voor het opsporen van eierstokkanker. Zo is er ook CA15-3 en CA19-9 die respectievelijk borst- en alveesklierkanker kunnen aantonen. CEA is het carcinoembryogeen antigeen waarmee vooral darmkanker wordt opgespoord. Het prostaatspecifiek antigeen of PSA wordt gebruikt als merker voor prostaat kanker [49].

*Tabel 1: De verschillende tumormerkers met de bijhorende kankers [48].*

<b>Tumormerker</b>	<b>Soort kanker</b>
CA125	Eierstokkanker
CA15-3	Borstkanker
CA19-9	Alveesklierkanker
CEA	Darmkanker
PSA	Prostaat kanker



## 5 Materiaal en methode

### 5.1 Materiaal

#### 5.1.1 Stalen

Een serum pool van een normale populatie werd gebruikt voor de optimalisatie van de ELISA test. Deze stalen werden verkregen van het Algemeen Medisch Laboratorium (AML) te Antwerpen en werden bewaard op  $-18^{\circ}\text{C}$ .

De stalen van kankerpatiënten zijn ook afkomstig uit het AML. Er werden stalen gebruikt van verschillende soorten kankers, nl. darmkanker, borstkanker, pancreaskanker, eierstokkanker en prostaatkanker.

##### 5.1.1.1 Staalvoorbereidingen

De ELISA metingen van het complex gebeuren zonder behandelingen van de stalen. Voor de meting van de totale activiteit van het nagalase (vrij en gedissocieerd nagalase) wordt ammoniumsulfaat toegevoegd aan het staal volgens de methode die Albrachts heeft beschreven. Ammoniumsulfaat dissocieert het complex en doet de activiteit van het nagalase dus toenemen in het staal. De stalen worden tien maal verdund met 75%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en na een half uur incuberen gecentrifugeerd op 3500g gedurende één uur. Het resulterende supernatant wordt verwijderd, de pellet wordt geresuspendeerd in natriumcitraatbuffer.

### 5.1.2 Reagentia

#### 5.1.2.1 ELISA

Het *capture* antilichaam gebruikt in de ELISA is het humane alfa-N-acetylgalactosaminidase antilichaam (R&D Systems). Hiervan werd 100  $\mu\text{g}$  opgelost in 1 ml PBS en gealiquoteerd per 100  $\mu\text{l}$  met een concentratie van 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Dit antilichaam is opgekweekt in schapen met het gen voor humaan alfa-N-acetylgalactosaminidase. Voor de *coating* van de plaat moet de stockoplossing tot 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdund worden met coatingsbuffer. Deze coatingsbuffer is een bicarbonaatbuffer met een concentratie van 100 mM en pH 9,6. De *blocking* oplossing is een 5% Tween-20 oplossing (detergent) in PBS. Het reagent diluent heeft dezelfde samenstelling als de *blocking* oplossing nl. een 5% Tween-20 oplossing in PBS. De *wash solution* die gebruikt wordt om de platen te wassen is een 0,05% Tween-20 oplossing in PBS. Het detectieantilichaam is een humaan Gc-globuline antilichaam (DAKO) opgekweekt in en geïsoleerd uit konijnen. Aan dit antilichaam werd het enzym *horseradish* peroxidase geconjugeerd (uitgevoerd door een extern bedrijf) zodat het polyclonaal konijnen anti-humaan Gc-globuline HRP conjugaat bekomen wordt met een concentratie van 1,08 mg/ml. Dit wordt 1000 maal verdund met reagent diluent tot een concentratie van 1,08  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Het substraat voor de *horseradish* peroxidase is 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine afkomstig van de kit TMB 2-Component Microwell Peroxidase (SeraCare). Deze kit bestaat uit 2 componenten: TMB peroxidase substraat en peroxidase substraat B. Deze 2 componenten moeten met gelijke hoeveelheden gemengd worden en zo toegevoegd worden aan het staal. Als stopoplossing van de reactie wordt 0,2 M HCl (Sigma) gebruikt.

#### 5.1.2.2 Fluorescence assay

De verdunningen voor de dissociatie van het complex worden gemaakt met 75% ammoniumsulfaat. 75% ammoniumsulfaat wordt gemaakt uitgaande van een 100% ammoniumsulfaatoplossing verdund met een natriumcitraatbuffer van 50 mM met pH 5,8.

Het fluorescent substraat dat gebruikt wordt in deze assay is 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -N-acetyl-D-galactosaminide dat gestockeerd is op  $-18^{\circ}\text{C}$  bij Epsilon Biotech met een concentratie van 0,5 mg/ml. Deze stockoplossing wordt 60 maal verdund tot de werkoplossing met PBS.

### 5.1.3 Victor Plate Reader

De activiteit van nagalase en de hoeveelheid complex worden bepaald met de Victor X4 Multilabel Plate Reader van Perkin Elmer (Figuur 9). De Victor X4 kan fluorescentie, luminescentie en absorbantie meten. De activiteiten van het nagalase enzym wordt gemeten met fluorescentie, de hoeveelheid van het complex daarentegen met absorbantie. Dit toestel heeft een ingebouwde temperatuurregelaar zodat de temperatuur exact kan ingesteld worden op de optimale reactietemperatuur van de enzymen. Dankzij deze temperatuurcontrole wordt de Victor X4 ook gebruikt om te incuberen en schudden. Samen met het softwarepakket WorkOut wordt de enzymactiviteit berekend aan de hand van een standaardreeks. Deze standaardreeks wordt gemaakt met de serumpool verdund met PBS.

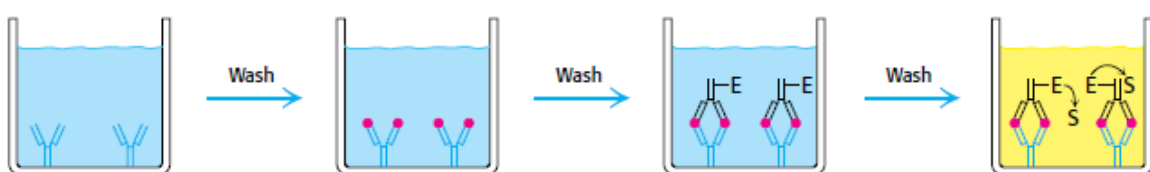


*Figuur 9: De Victor X4 Multilabel Plate Reader*

## 5.2 Methode

### 5.2.1 Complexmeting

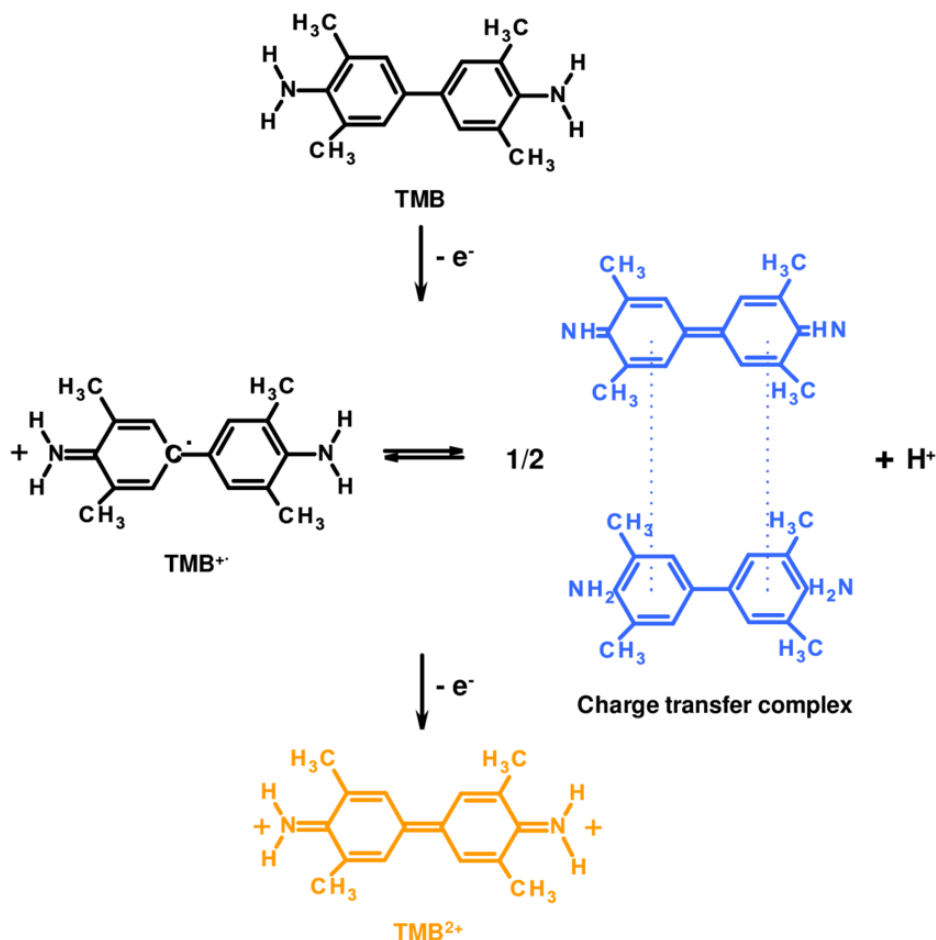
Om het complex in het plasma aan te tonen, wordt een sandwich ELISA gebruikt (Figuur 10). Een sandwich ELISA kwantificeert antigenen tussen 2 lagen antilichamen. Het eerste antilichaam (primaair Ab) zit gecoat op de wells van een 96 well plaat en bindt aan één epitoot van de macromolecule, het tweede antilichaam (secundair Ab) zal binden aan een tweede epitoot van de macromolecule. Aan het laatste antilichaam zit een enzym gebonden dat een bepaald substraat omzet naar een detecteerbaar signaal. De sandwich ELISA gebruikt in deze test werd opgesteld op basis van de protocollen van 2 sandwich ELISA's, één specifiek voor nagalase en één specifiek voor DBP.



*Figuur 10: Het principe van sandwich ELISA [9]*

### 5.2.1.1 Sandwich ELISA

Een sandwich ELISA werd ontwikkeld om het complex te detecteren (Bijlage 1). Een kleurloze multiwellplaat wordt gecoat met het *capture* antilichaam, nl. het anti-nagalase antilichaam. Zo bindt het complex aan de *wells* via nagalase. Vervolgens wordt een secundair Ab toegevoegd, nl. anti-DBP dat bindt aan het DBP gedeelte van het complex. Het detectieantilichaam is geconjugeerd met het enzym horseradish peroxidase, dat het substraat, tetramethylbenzidine omzet naar tetramethylbenzidine diimine, een blauw product. Na een kwartier incuberen op kamertemperatuur wordt de reactie stopgezet met HCl en is er een kleuromvorming van blauw naar geel (Figuur 12). De absorbantie wordt vervolgens gemeten op een golflengte van 450 nm. Het signaal zal dan evenredig zijn met de hoeveelheid complex dat aanwezig is in het staal [50].



Figuur 11: De reactie van TMB tot een blauw product. Door het toevoegen van de stopoplossing gebeurt er een kleuromvorming van blauw naar geel [51].

### 5.2.1.2 Detectie van het complex

Eerst wordt het bestaan van het complex aangetoond. Dit wordt gedaan door middel van het sandwich ELISA protocol toe te passen op de serum pool die één tot acht maal verdund is. De stalen worden verdund met PBS. Bij deze test worden ook de optimale concentraties van de reagentia bepaald zoals de optimale verdunning om stalen te onderzoeken en de optimale concentraties van de antilichamen om een goed detecteerbaar signaal te krijgen. Dit wil zeggen dat het signaal hoger ligt dan de blanco stalen ligt.



### 5.2.1.3 *Complexmeting van kankerstalen en controles*

Na het aantonen van het bestaan van het complex worden metingen uitgevoerd op kankerstalen en normale controles. Uit de voorgaande test is gebleken dat de stalen onverdund gemeten moeten worden om een significant detecteerbaar signaal te bekomen. Ook deze metingen volgen het bovenstaande protocol van de sandwich ELISA.

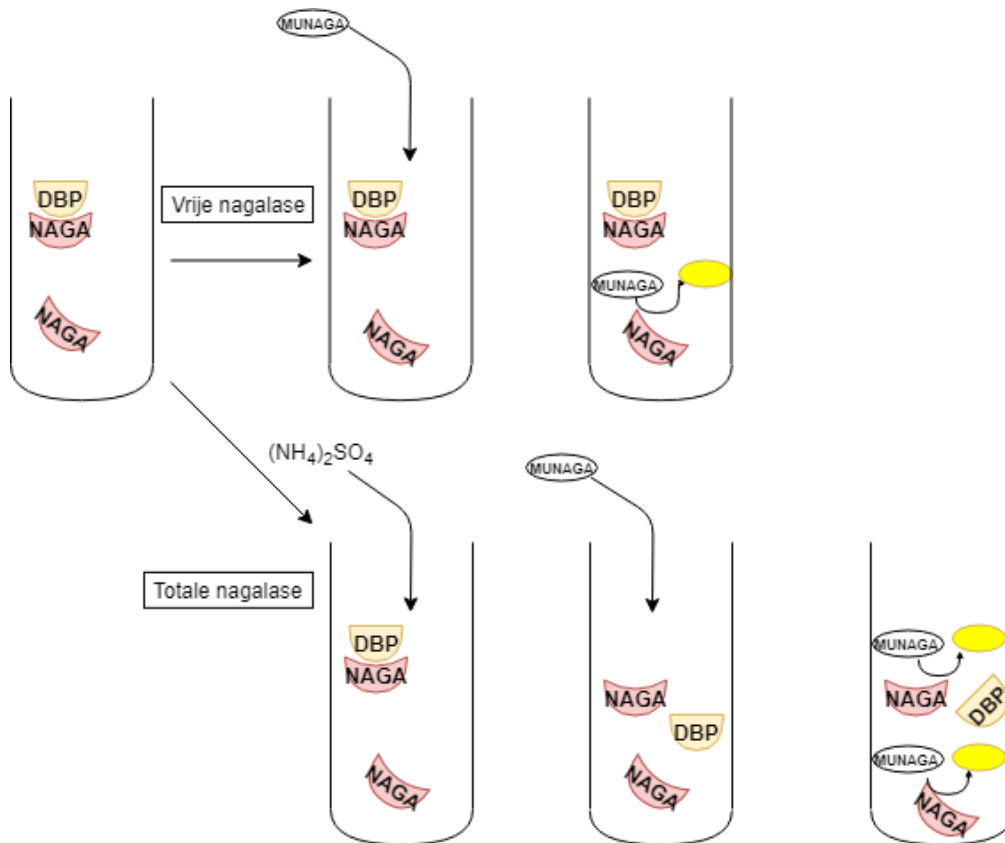
## 5.2.2 Nagalase-activiteit meting

### 5.2.2.1 *Fluorescent assay*

De meting van de activiteit van nagalase verloopt met een *fluorescent assay* (FA) volgens het protocol in Bijlage 2. Bij een *fluorescent assay* zal het enzym een substraat omzetten naar een detecteerbaar fluorescent product. Deze fluorescentie kan dan gemeten worden en zal zo evenredig zijn met de activiteit van het signaal. Voor deze test is een standaardreeks nodig om de activiteit te kunnen bepalen. Een seriële reeks wordt gemaakt met reële stalen gaande van één maal tot 64 maal verdunning. Het staal dat gemeten wordt is tien maal verdund. Hier wordt het substraat aan toegevoegd, nl. 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -N-acetyl-D-galactosaminide. Nagalase aanwezig in het serum zal dit substraat omzetten naar het fluorescente product 4-methylumbelliferrone. Toevoeging van bicarbonaat met pH 10 zal de reactie stoppen. De reactie stopt door de verandering van pH waarbij het enzym niet meer actief is door onomkeerbare veranderingen in zijn structuur. Vervolgens wordt de fluorescentie gemeten met de Victor X4 op golflengte 460 nm/340nm.

### 5.2.2.2 *Dissociatie complex*

Aan het staal zal 75% ammoniumsulfaat toegevoegd worden wat leidt tot de dissociatie van nagalase van het complex. Zo komt het oorspronkelijk gecomplexeed nagalase vrij in het staal. Dit kan dan gemeten worden met de *fluorescence assay*. Het verschil in activiteiten tussen de nagalase na en voor de dissociatie is dan gelijk aan de activiteit van de fractie die oorspronkelijk was gebonden aan het complex. Indien nagalase volledig gedissocieerd is van het complex, is dit een maat voor de hoeveelheid of activiteit van het complex.

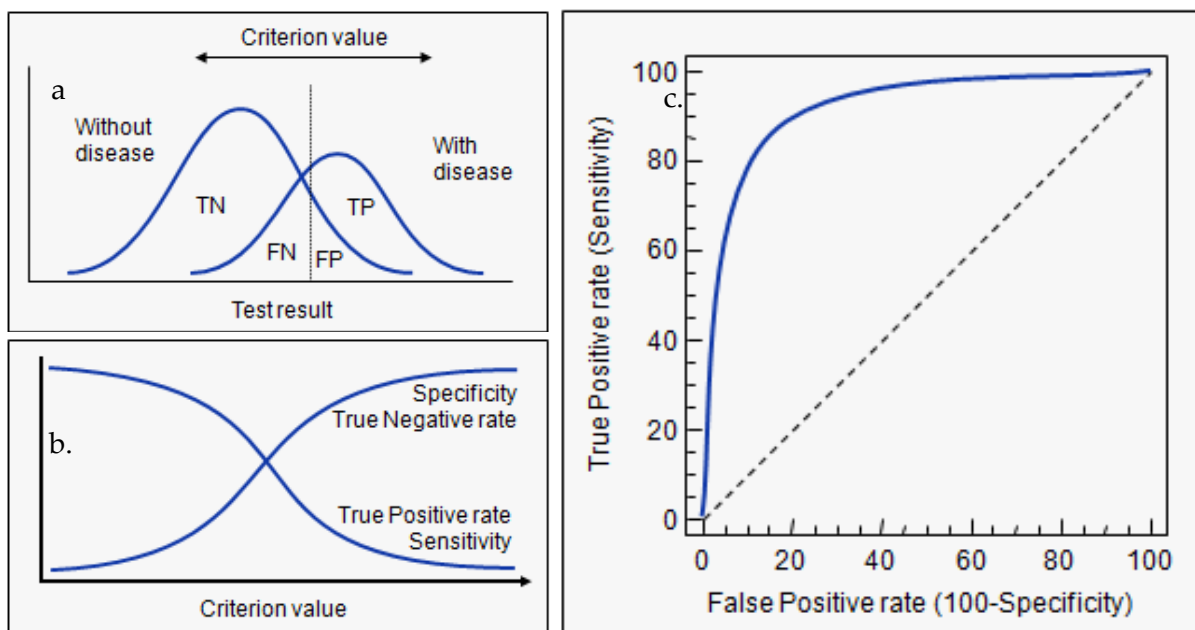


Figuur 12: Principe van de meting van de nagalaseactiviteiten. Door het toevoegen van ammoniumsulfaat zal het complex dissociëren. DBP = vitamine D bindend proteïne, NAGA = nagalase, MUNAGA = 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -N-acetyl-D-galactosaminide

### 5.2.3 ROC curve

De relative operating characteristic (ROC) curve is een waarschijnlijkheidscurve dat het vermogen van een test om een onderscheid te maken tussen gezonde en zieke personen weergeeft. De stalen worden gecategoriseerd volgens gezonde en zieke personen. In Figuur 13a zien we 2 populaties waarvan 1 met ziekte en de andere zonder. Het komt bijna nooit voor dat er een perfecte scheiding is tussen de 2 groepen, er is altijd een deel dat overlapt. Voor elke cutoff of *criterion value*, zullen er gevallen zijn waarbij de ziekte correct geïdentificeerd wordt (*true positive*), maar ook gevallen waarbij de ziekte als negatief beschouwd wordt (*false negatives*). Omgekeerd zijn er juist geclassificeerde negatieven gevallen (*true negatives*) en fout geclassificeerd als positieven (*false positives*). Figuur 13b toont aan dat bij een hogere *criterion value* de fractie *false positives* zal afnemen en specificiteit zal toenemen, maar tegelijk zullen de *true positives* en de sensitiviteit afnemen.

Figuur 13c toont een ROC-curve. Op de x-as wordt de kans op *false positives* of 100-specificiteit weergegeven. Op de y-as wordt de kans op *true positives* of de sensitiviteit weergegeven. Een gewenst resultaat is wanneer de curve boven de diagonaal loopt en de waarde onder de curve (*area under the curve* of AUC) één benadert. Dit wil namelijk zeggen dat alle zieken geïdentificeerd kunnen worden zonder fout-positieven. Een AUC van 0,5 is geen gewenst resultaat want dit betekent dat er evenveel *true positives* als *false positives* gedetecteerd worden. Hoe hoger het AUC is, hoe groter de diagnostische accuraatheid dat deze test biedt om een onderscheid te maken tussen gezonden en zieken. Het programma dat gebruikt wordt om de ROC-curves op te stellen is MedCalc [52].



Figuur 13: a. Grafiek met de false en true positives en negatives in functie van de testresultaten. b. Grafiek met de specificiteit, sensitiviteit, true negatives en true positives in functie van de criterion value. c. Een voorbeeld van een ROC-curve [52].

#### 5.2.4 Ratio van het complex ten opzichte van de mediaan van de normale controles

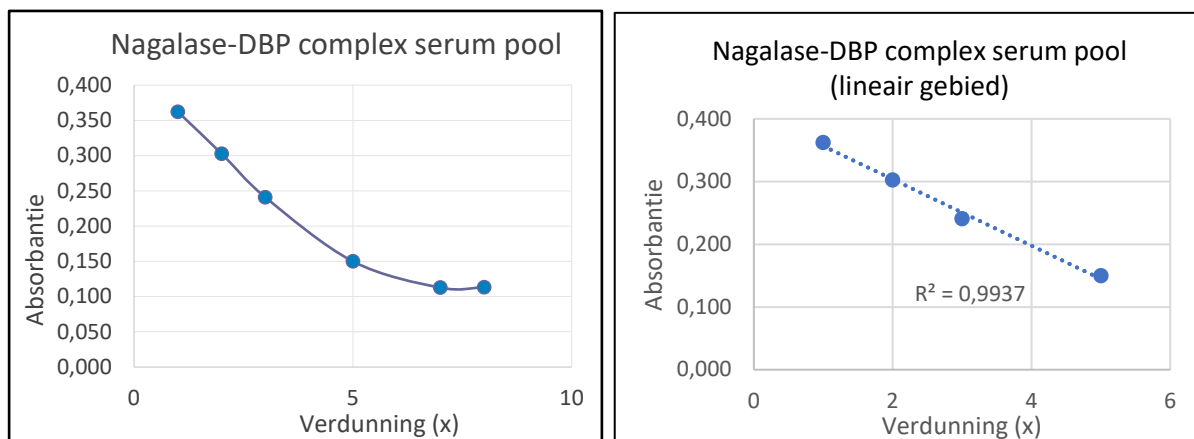
Om een statistisch interessante en vergelijkbare waarde van een merker te krijgen, zal de waarde van deze merker van de kankerstalen gedeeld worden door de mediaan van de normale controle. Hiermee wordt een waarde verkregen zonder eenheid wat beter vergeleken kan worden. Dit wordt toegepast op de stalen van een kankerpatiënt wiens bloedwaarden werden opgevolgd in functie van de tijd.

Er worden vervolgens twee percentielen berekend die dienen als minimale en maximale cutoff waarden, nl. 10% en 90%. Deze percentielen worden berekend aan de hand van de ratio's van de complexmetingen van de normale controles.

## 6 Resultaten

### 6.1 Complexbepaling

In Figuur 14 wordt de absorbantie uitgezet ten opzichte van de verdunning van de serum pool. Er is een lineair verband te zien bij de eerste 4 verdunningen, nl. verdunning 1, 2, 3 en 5. Dit lineair verband wordt bevestigd door  $R^2$  van 0,9937. Bij verdere verdunningen is er een afbuiging naar absorptiewaarden van 0,100. Deze verdunningen geven een te laag signaal dat te dicht bij de detectielimiet ligt.



Figuur 14: Resultaten van de sandwich ELISA voor het complex.

### 6.2 Staalmetingen

Er zijn in totaal 37 stalen van normale controles die gebruikt worden als referentie. De gegevens van deze stalen zijn weergegeven in Tabel 2. De nagalasesmetingen zijn opgedeeld in 3 waarden namelijk de vrije nagalase (free nagalase of fnaga), de totale nagalase (total nagalase of tnaga) en het verschil in totale en vrije nagalase (delta nagalase of dnaga) dat een maat is voor de nagalasehoeveelheid die gebonden was aan het DBP (nagalase-DBP-MAF-complex). De verschillende kankerstalen worden vervolgens vergeleken met deze waarden.

Tabel 2: Overzicht van de gegevens van de normale controles

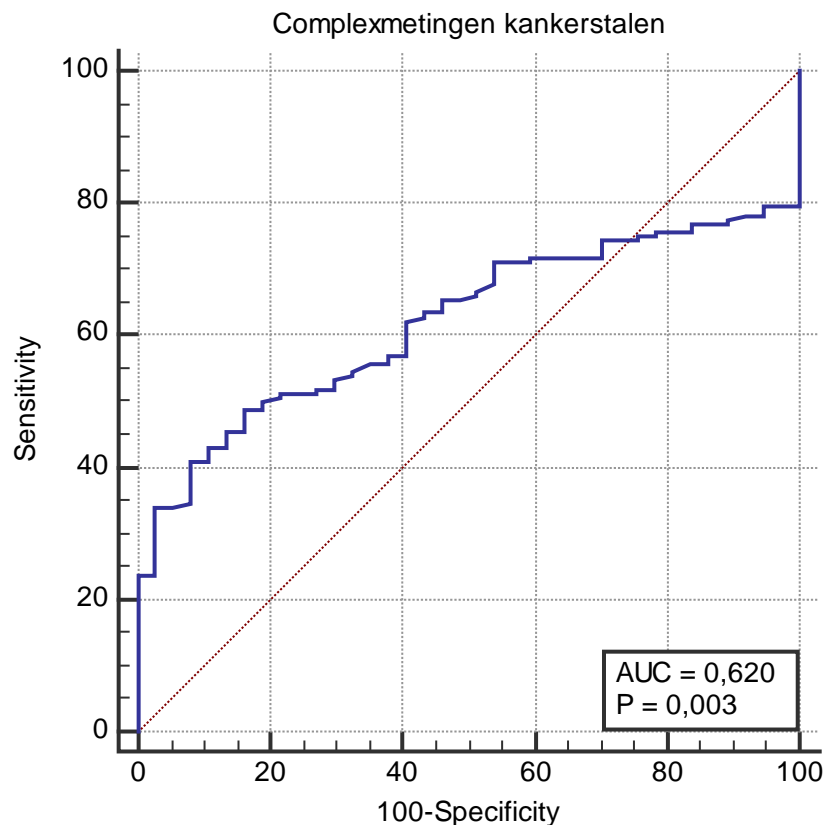
		Aantal stalen	37
<b>Complexmetingen</b>		<b>Laagste waarde</b>	0,2630
		<b>Hoogste waarde</b>	0,5560
		<b>Gemiddelde</b>	0,3391
		<b>Mediaan</b>	0,3390
<b>Nagalasesmetingen</b>	<b>Fnaga</b>	<b>Laagste waarde</b>	0,1600
		<b>Hoogste waarde</b>	0,9600
		<b>Gemiddelde</b>	0,5268
		<b>Mediaan</b>	0,4900
	<b>Tnaga</b>	<b>Laagste waarde</b>	0,6700
		<b>Hoogste waarde</b>	2,3900
		<b>Gemiddelde</b>	1,5246
		<b>Mediaan</b>	1,5800
	<b>Dnaga</b>	<b>Laagste waarde</b>	0,000
		<b>Hoogste waarde</b>	1,800
		<b>Gemiddelde</b>	0,9986
		<b>Mediaan</b>	1,0500

### 6.2.1 Vergelijking met alle kankerstalen

De nagalase- en complexmetingen van de kankerstalen worden vergeleken met de normale controles. In totaal zijn er samen 156 kankerstalen van 5 verschillende kankers. De bekomen resultaten worden hieronder weergegeven.

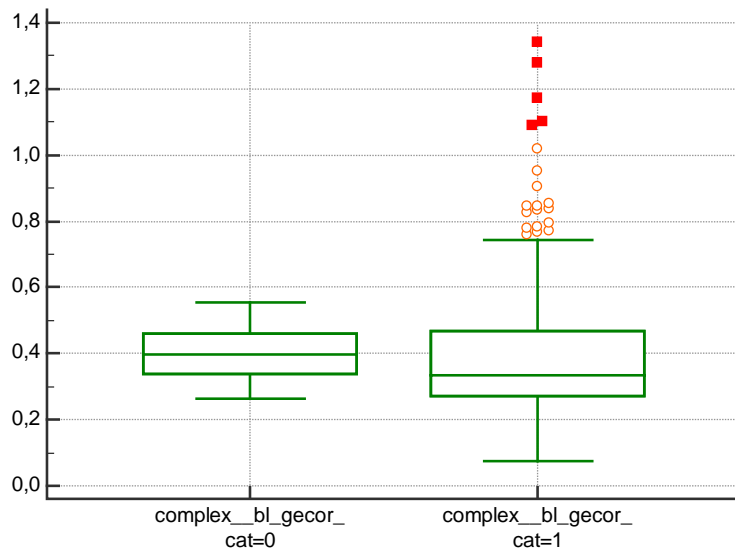
#### 6.2.1.1 Complexresultaten

In Figuur 15 is de ROC-curve weergegeven van de complexvorming tussen normale controles en kankerstalen. De AUC is 0,620 en het is significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ). Dit wil zeggen dat op basis van de complexmetingen een onderscheid gemaakt kan worden tussen de gezonde stalen en de kankerstalen.



*Figuur 15: ROC-curve van de complexmetingen van alle gemeten stalen (kankerstalen en normale controles). AUC = Area Under Curve*

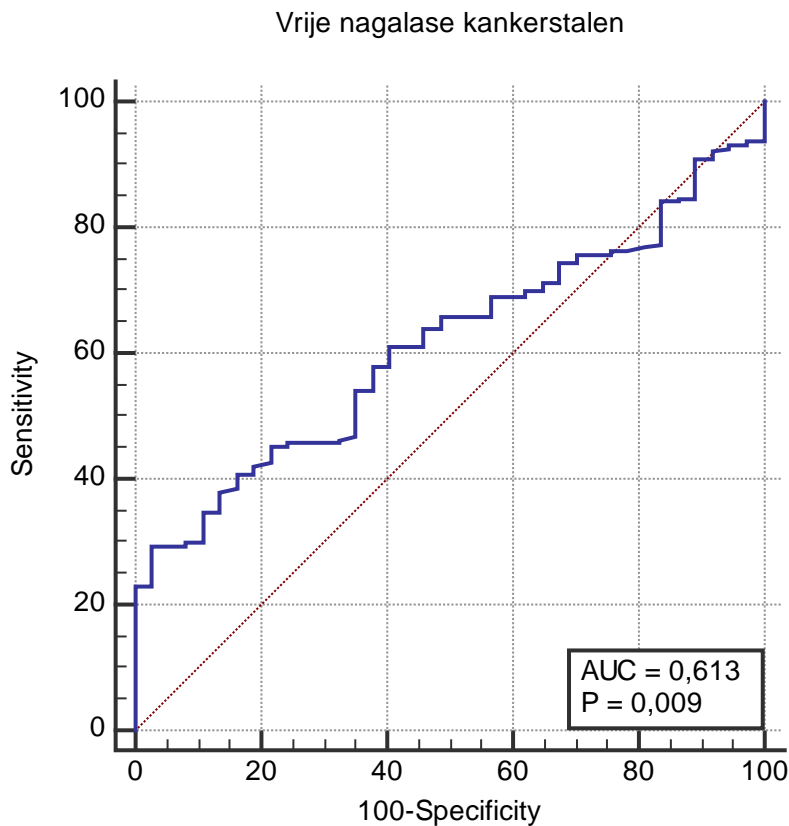
In de box-plot weergegeven in Figuur 16 is het duidelijk dat er veel uitschieters zitten in de resultaten van de kankerstalen. De mediaan voor complexvorming bij de normale controles is 0,3990 en ligt hoger dan deze van de kankerstalen welke 0,3325 is.



Figuur 16: Box-plot van de complexmetingen van alle gemeten stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": kankerstalen

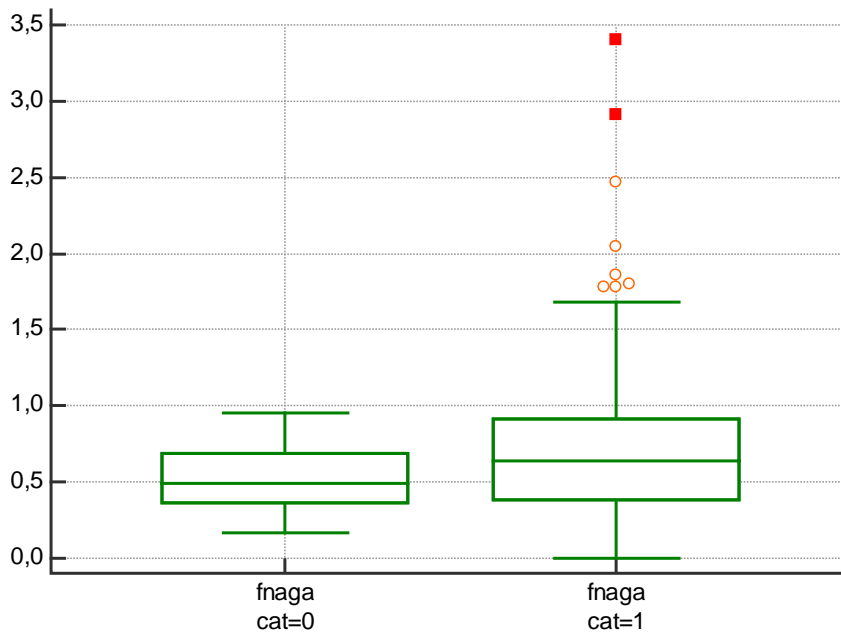
### 6.2.1.2 Vrije nagalase

De ROC-curve van de vrije nagalase in Figuur 17 geeft geen gewenste resultaten om een onderscheid te kunnen maken tussen gezonde en kankerstalen. De AUC waarde is 0,613 en is hier wel significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ). Hierdoor kan er op basis van vrije nagalase een onderscheid tussen gezonde en kankerstalen gemaakt worden.



Figuur 17: ROC-curve van de vrije nagalase-metingen van alle gemeten stalen (kankerstalen en normale controles). AUC = Area Under Curve

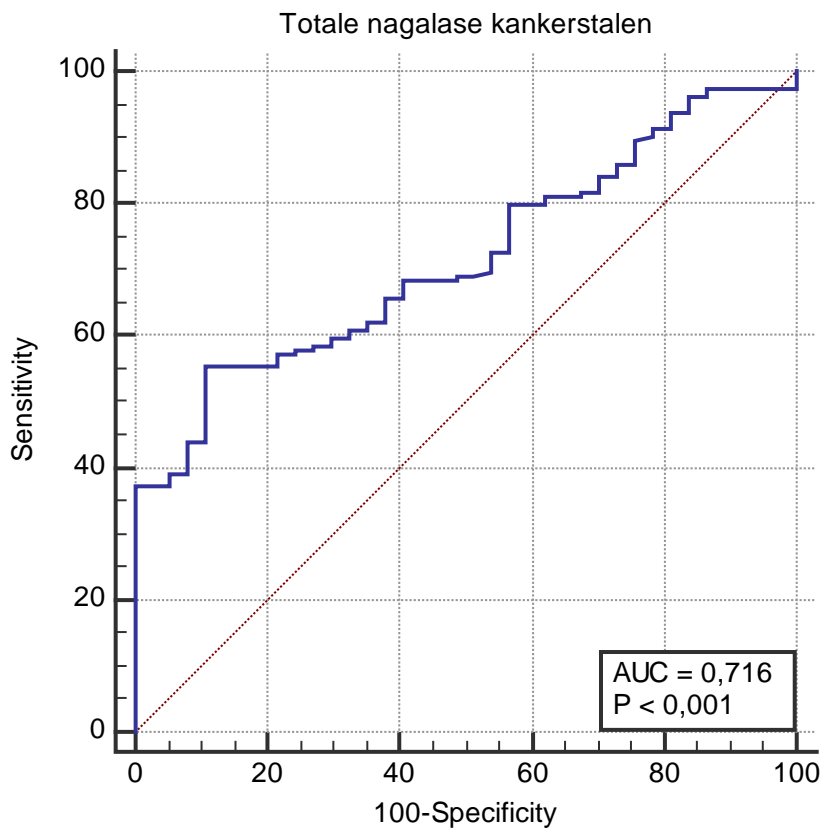
De box-plot in Figuur 18 bevestigt de waarden van de ROC-curve. Ook hier zijn net zoals bij de complexmetingen veel uitschieters te vinden bij de kankerstalen. De mediaan van vrije nagalase van de kankerstalen (cat=1) is hoger dan deze van gezonde stalen (cat=0). De mediaan voor de gezonde stalen is namelijk 0,4940 ten opzichte van 0,6395 voor de kankerstalen.



*Figuur 18: Box-plot van de vrije nagalase van alle gemeten stalen (kankerstalen en normale controles). "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": kankerstalen*

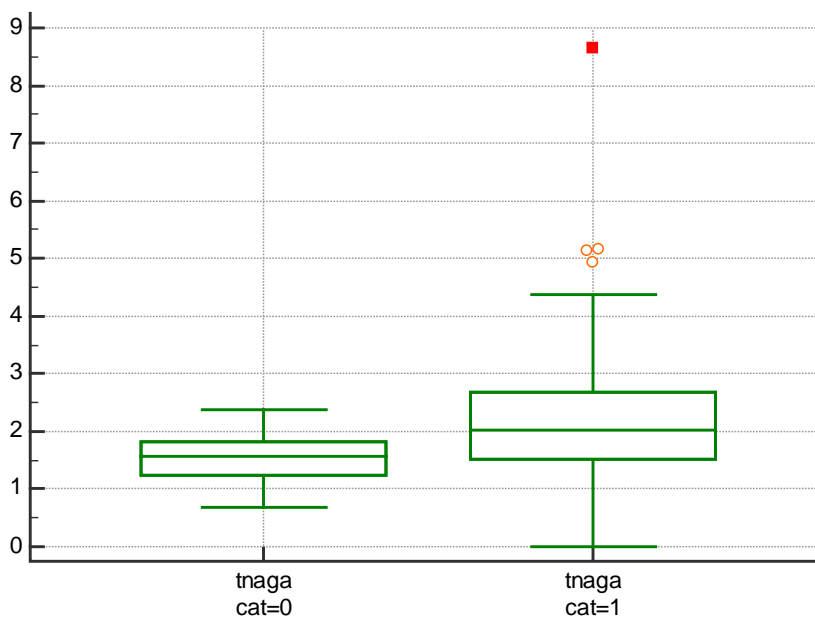
#### 6.2.1.3 Totale nagalase

In de ROC-curve van de totale nagalase is er een verschil te zien tussen gezonde en kankerstalen (Figuur 19). De AUC-waarde is 0,716 en is significant verschillend van 0,500. Op basis van totale nagalase kan een onderscheid gemaakt worden tussen gezonde en kankerstalen.



Figuur 19: ROC-curve van de totale nagalase-metingen van alle gemeten stalen (kankerstalen en normale controles). AUC = Area Under Curve

De box-plot in Figuur 20 toont dat de mediaan hoger ligt voor kankerstalen, nl. 2,0255 ten opzichte van 1,5800 voor de normale controles. Er zijn minder uitschieters dan bij vrije nagalase.

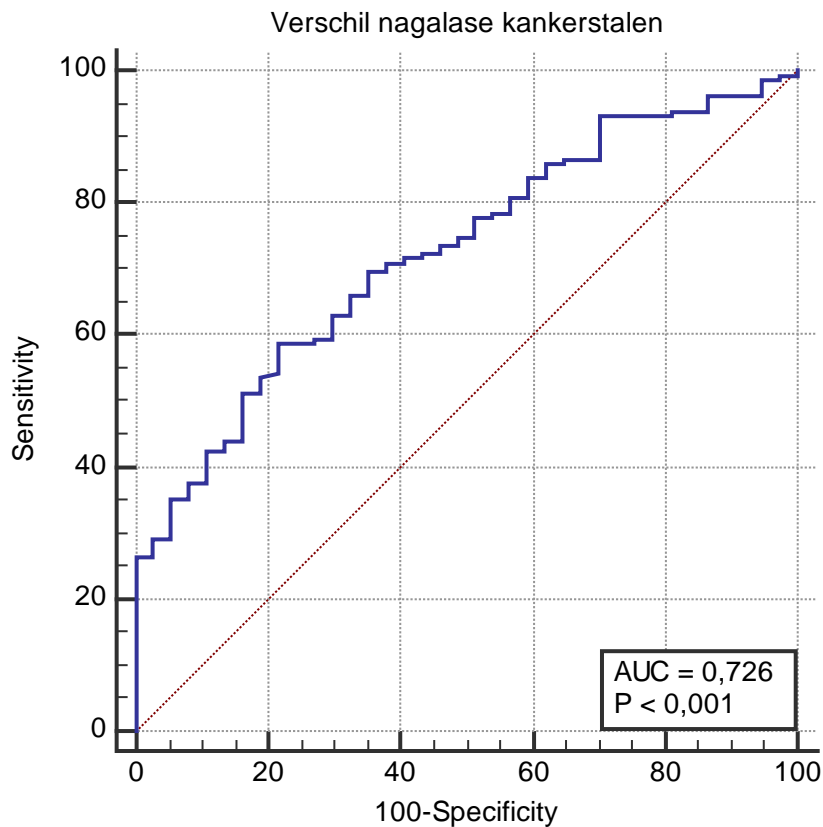


Figuur 20: Box-plot van de totale nagalase-metingen van alle gemeten kankerstalen. "cat=0": normale controle, "cat=1": kankerstalen



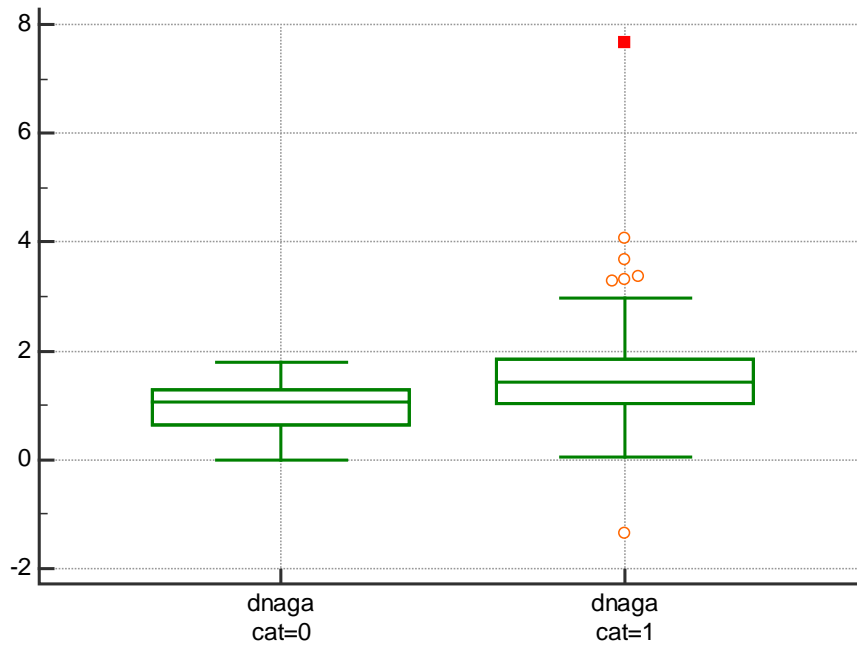
#### 6.2.1.4 Verschil in totale en vrije nagalase

De ROC-curve in Figuur 21 van het verschil in nagalase heeft een AUC-waarde van 0,726 en is significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ). Deze test zal beter een onderscheid kunnen maken tussen gezonde en kankerstalen ten opzichte van de test voor complexmeting, vrij nagalase en totale nagalase vanwege de hogere AUC waarden. De mediaan ligt ook hoger voor de kankerstalen ten opzichte van de gezonde stalen.



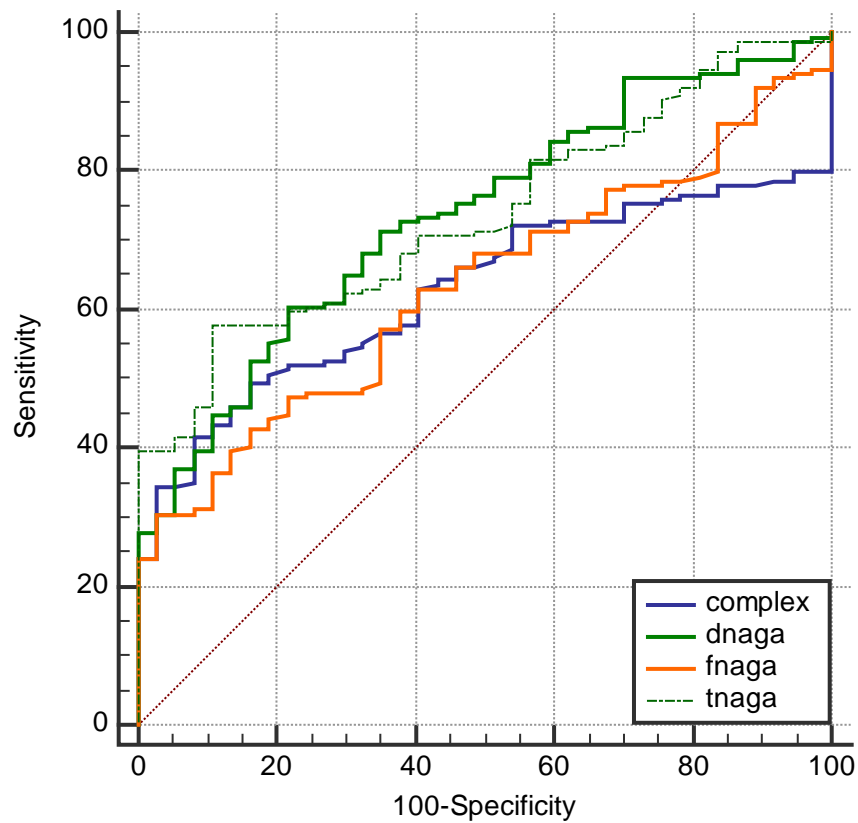
Figuur 21: ROC-curve van het verschil in nagalase van alle stalen (kankerstalen en normale controles). AUC = Area Under Curve

De box-plot in Figuur 22 toont het verschil aan tussen de mediaan van de kankerstalen (1,4290) en de gezonde stalen (1,0530). De mediaan van de kankerstalen ligt dus hoger dan deze van de gezonde stalen. De waarden van de kankerstalen hebben nog een aantal uitschieters.



Figuur 22: Box-plot van het verschil in nagalase van alle stalen (kankerstalen en normale controles). “cat=0”: normale controles, “cat=1”: kankerstalen

#### 6.2.1.5 Overzicht ROC-curves



Tabel 3: Overzicht van gegevens van alle gemeten stalen

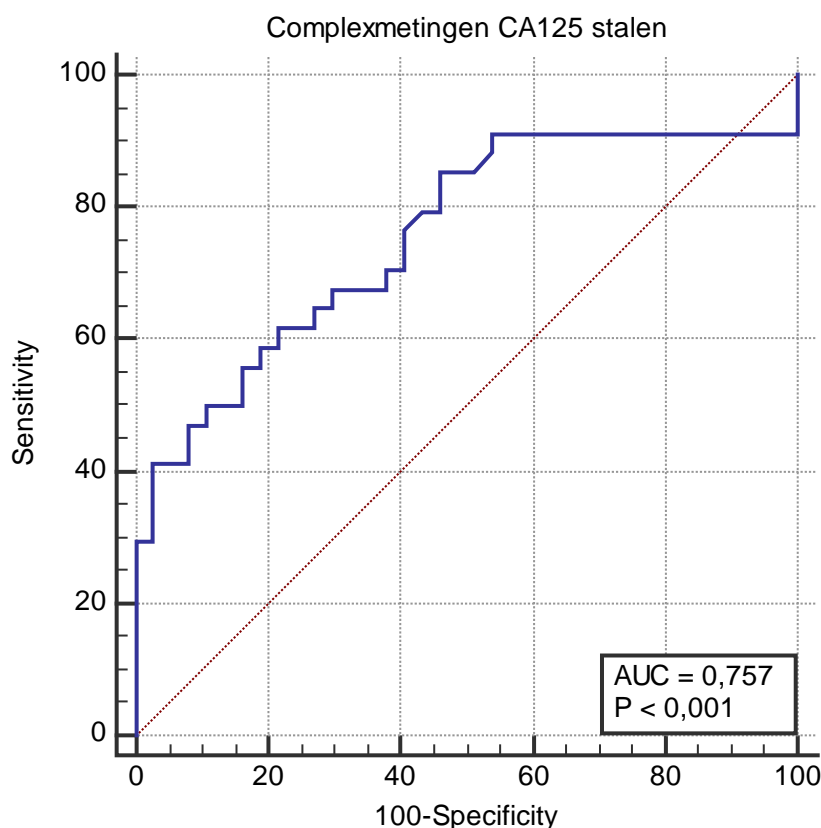
	Complex	fnaga	tnaga	dnaga
<b>AUC</b>	0,620	0,613	0,716	0,726
<b>P van AUC</b>	0,003	0,009	<0,001	<0,001
<b>Mediaan (kankerstalen)</b>	0,3325	0,6395	2,0255	1,4290
<b>Mediaan (normale controles)</b>	0,3990	0,4940	1,5800	1,0530

## 6.2.2 CA125

De stalen met een verhoogde CA125 tumormerker worden vergeleken met de normale controles op basis van complexmeting, vrije nagalase, totale nagalase en verschil in nagalase. Er werden 34 stalen gemeten met verhoogde CA125.

### 6.2.2.1 Complexmetingen

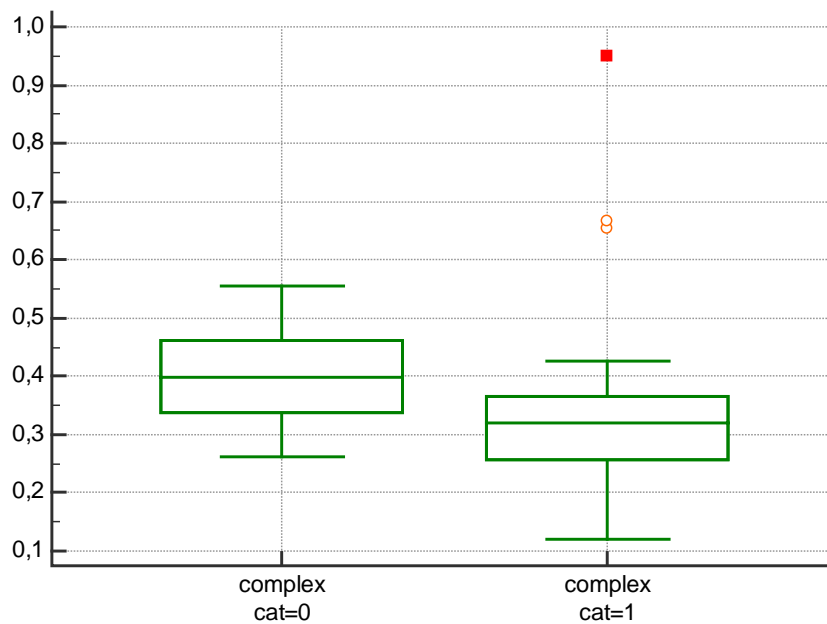
De ROC-curve in Figuur 23 toont dat er een AUC is van 0,757 is, dit wil zeggen dat er met behulp van de complexmetingen een onderscheid gemaakt kan worden tussen de gezonde en verhoogde CA125 stalen. Deze waarde is ook significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ). De complexmeting kan dus gebruikt worden om stalen te detecteren met verhoogde CA125.



Figuur 23: ROC-curve van de complexmetingen van de verhoogde CA125 stalen en normale controles. AUC = Area Under Curve

De box-plot in Figuur 24 toont dat er een significant verschil is tussen de mediaan van de gezonde stalen en de verhoogde CA125 stalen. De complexwaarden van de normale controles zijn immers hoger dan deze van de verhoogde CA125 stalen, nl. 0,3990 voor de normale

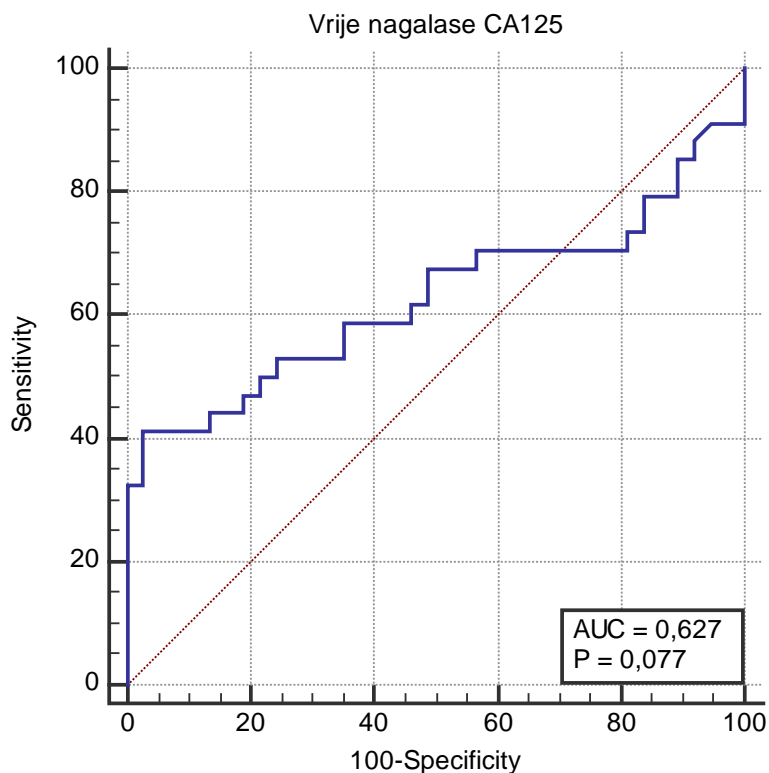
controles en 0,3110 voor de verhoogde CA125 stalen. De kankerstalen hebben enkele uitschieters.



*Figuur 24: Box-plot van de complexmetingen van de verhoogde CA125 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": verhoogde CA125 stalen*

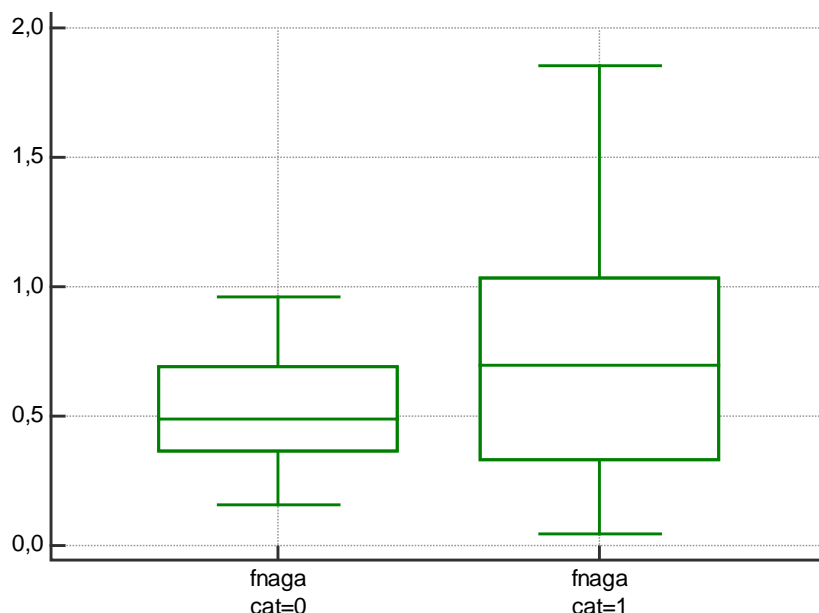
#### 6.2.2.2 Vrije nagalase

In de ROC-curve voor de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CA125 stalen wordt een AUC-waarde van 0,627 weergegeven (Figuur 25). Deze waarde is echter niet significant verschillend van 0,500 ( $P > 0,05$ ). Dit wil zeggen dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de verhoogde CA125 stalen op basis van de vrije nagalase-metingen.



Figuur 25: ROC-curve van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CA125 stalen. AUC = Area Under Curve

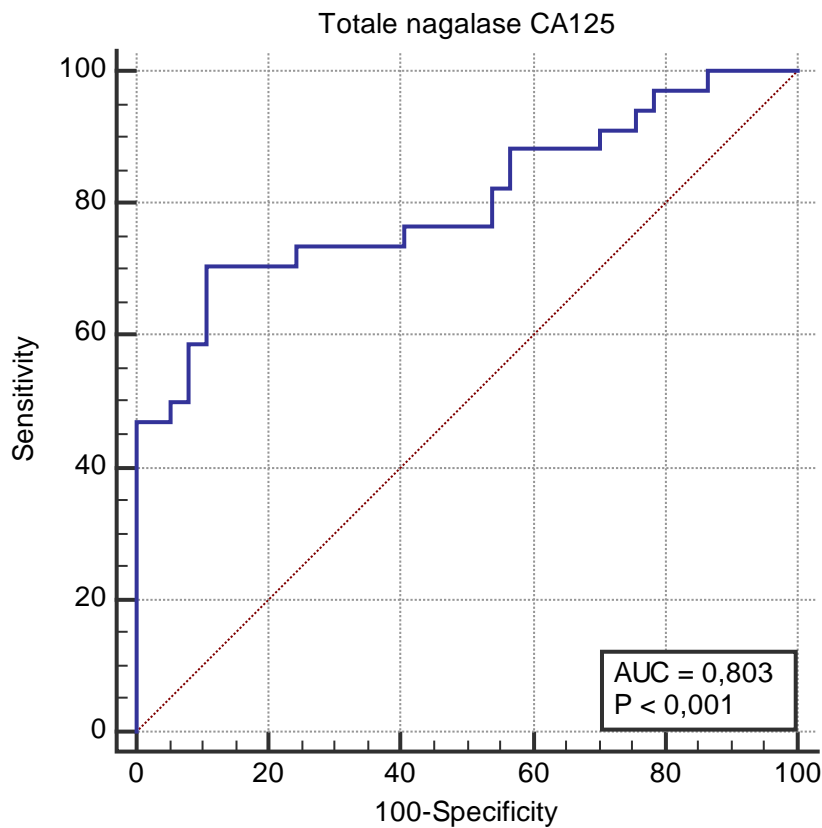
De box-plot voor de vrije nagalase-metingen toont dat de spreiding van de verhoogde CA125 stalen zeer groot is (Figuur 26). Dit verklaart waarom er geen significant onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de verhoogde CA125 stalen. De mediaan van de verhoogde CA125 stalen is 0,7015 ten opzichte van 0,4900 voor de normale controles.



Figuur 26: Box-plot van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CA125 stalen. "cat=0": normale controles, "cat=1": verhoogde CA125 stalen

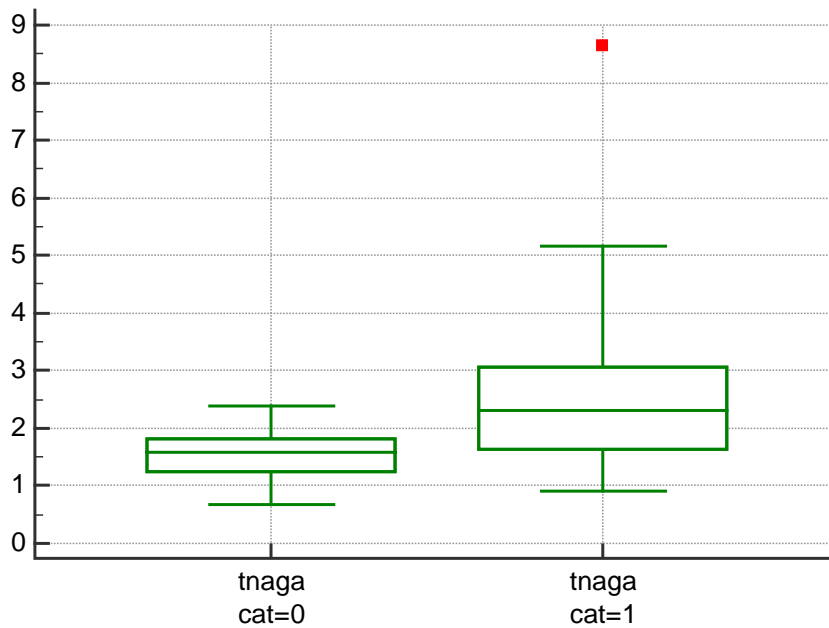
### 6.2.2.3 Totale nagalase

De ROC-curve laat zien dat er een onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de verhoogde CA125 stalen (Figuur 27). De AUC waarde is namelijk 0,803 en is significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ).



Figuur 27: ROC-curve van de totale nagalase-metingen van de verhoogde CA125 stalen. AUC = Area Under Curve

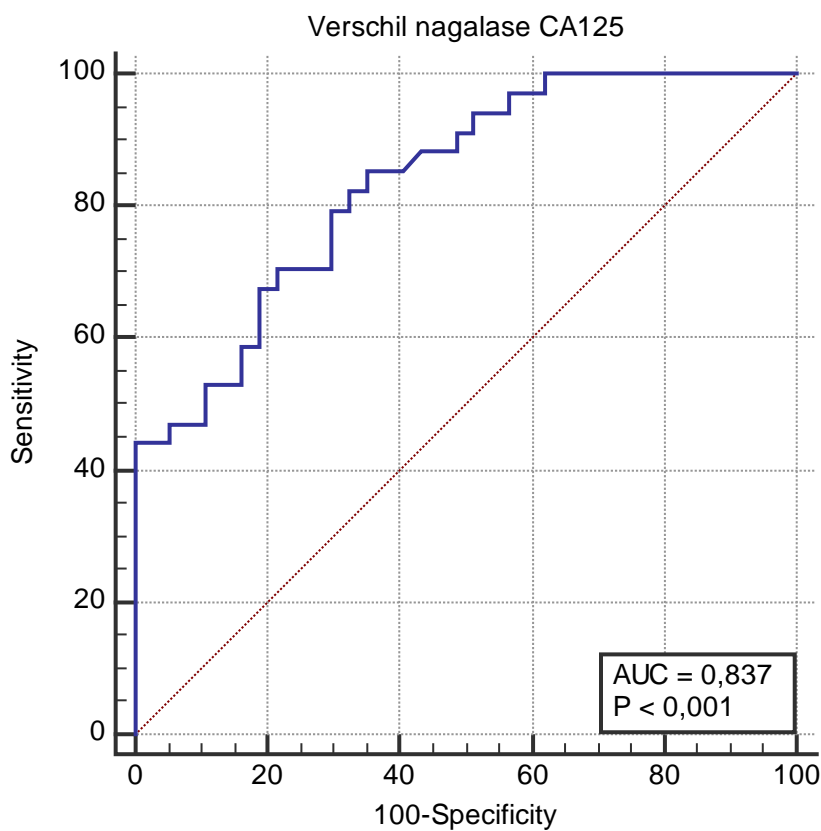
De mediaan van de totale nagalase van de normale controles is 1,5800 en is lager dan de verhoogde CA125 stalen welke 2,0395 bedraagt. Dit is ook duidelijk aan de hand van de box-plot in Figuur 28.



Figuur 28: Box-plot van de totale nagalase-metingen van de verhoogde CA125 stalen. “cat=0”: normale controles, “cat=1”: verhoogde CA125 stalen

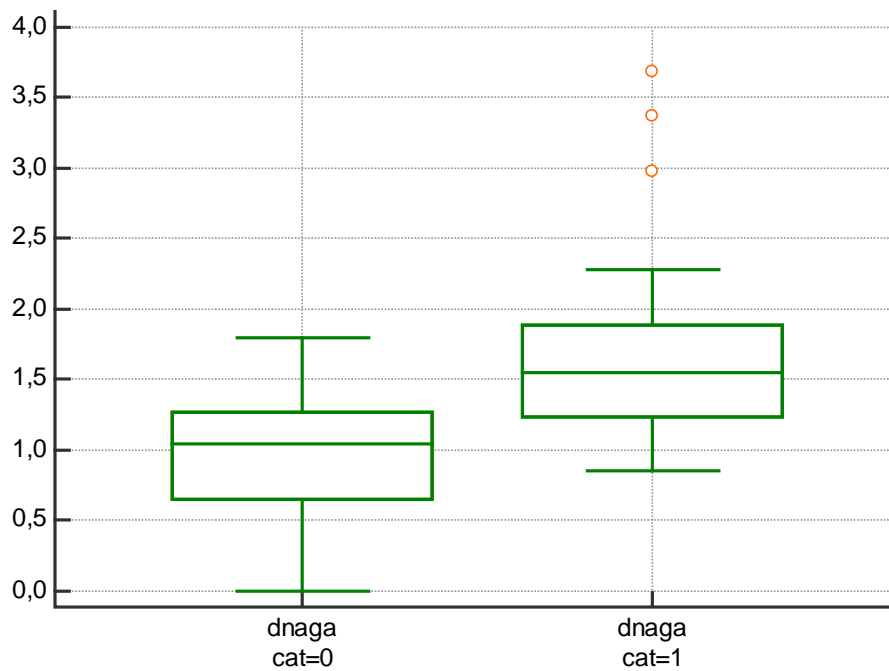
#### 6.2.2.4 Verschil nagalase

Ook in de ROC-curve van het verschil in nagalase in Figuur 29 kan aangetoond worden dat er verschil is tussen de normale controles en de verhoogde CA125 stalen. De AUC-waarde is hier 0,837 en is significant verschillend van 0,500.



Figuur 29: ROC-curve van het verschil in nagalase van verhoogde CA125 stalen. AUC = Area Under Curve

De box-plot geeft het verschil tussen de medianen weer (Figuur 30). De normale controles hebben een mediaan van 1,0500 en de stalen met verhoogde CA125 hebben een mediaan van 1,5600. Er zijn enkele uitschieters bij de verhoogde CA125 merkers.

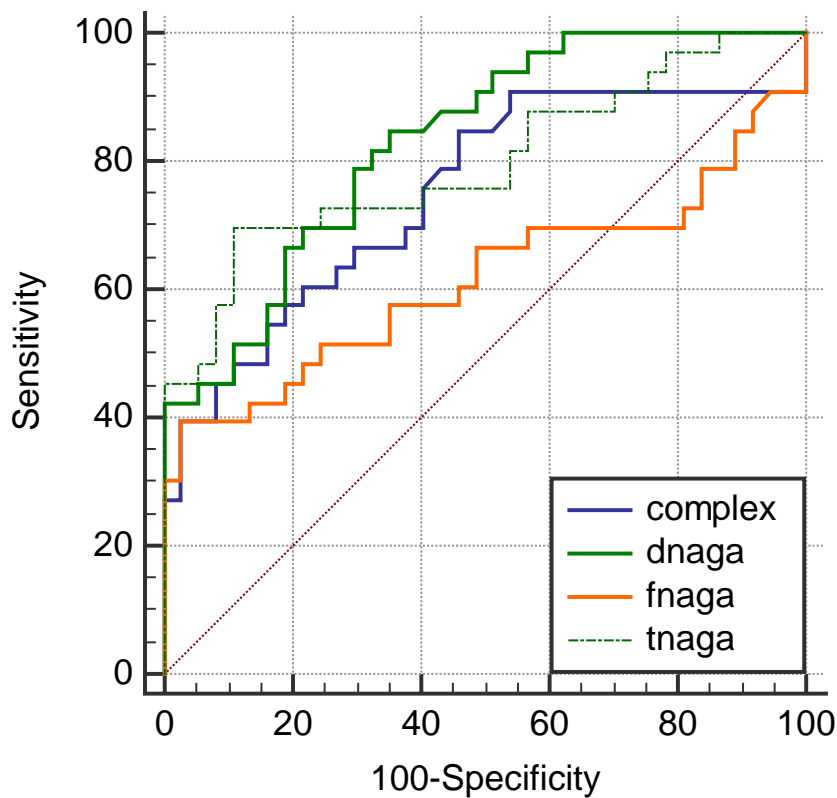


*Figuur 30: Box-plot van het verschil nagalase van de verhoogde CA125 stalen. "cat=0": normale controles, "cat=1": verhoogde CA125 stalen*

#### 6.2.2.5 Overzicht ROC-curves

In Figuur 31 en Tabel 4 is een overzicht weergegeven van alle ROC-curves. Hier is te zien dat de metingen van het verschil in nagalase de beste resultaten geeft. Enkel de meting van vrije nagalase kan verhoogde CA125 stalen en de normale controles niet onderscheiden.





Figuur 31: Overzicht van de verschillende ROC-curves voor de verhoogde CA125 stalen

Tabel 4: Overzicht van de gegevens van CA125

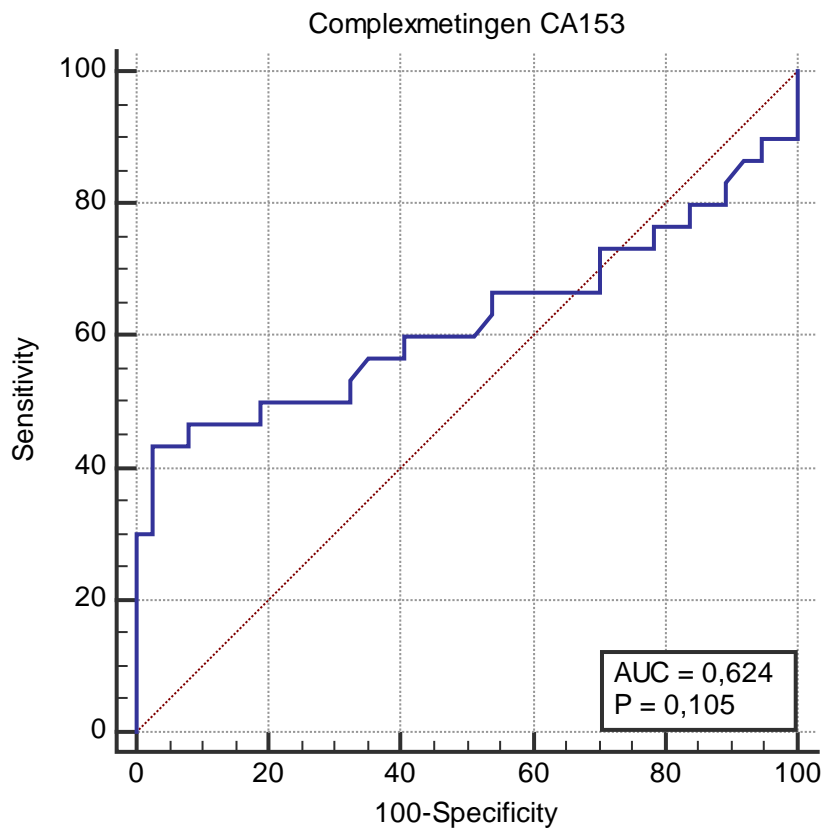
	<b>Complex</b>	<b>fnaga</b>	<b>tnaga</b>	<b>dnaga</b>
<b>AUC</b>	0,757	0,627	0,803	0,837
<b>P van AUC</b>	<0,001	0,077	<0,001	<0,001
<b>Mediaan (CA125 stalen)</b>	0,3110	0,7015	2,0395	1,5600
<b>Mediaan (normale controles)</b>	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530

### 6.2.3 CA153

De stalen met een verhoogde CA153 tumormerker worden vergeleken met de normale controles op basis van complexmeting, vrije nagalase, totale nagalase en verschil in nagalase. In totaal zijn er 30 stalen gemeten met verhoogde CA153.

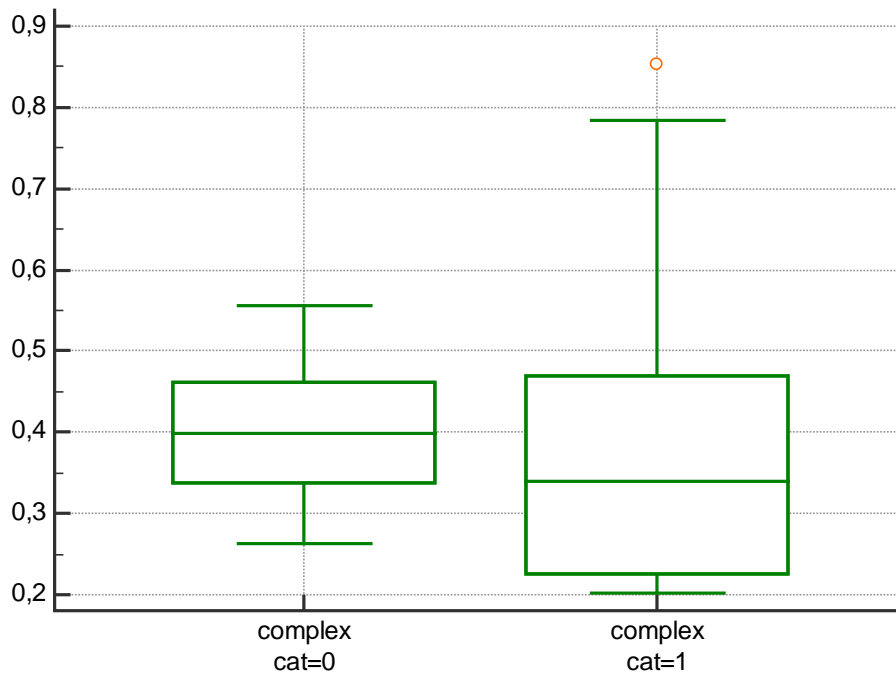
#### 6.2.3.1 Complexmetingen

In de ROC-curve van de complexmetingen voor verhoogde CA153 stalen (Figuur 32) blijkt dat het meten van het complex geen onderscheid maakt tussen normale controles en stalen met verhoogde CA153. De AUC-waarde is 0,624, maar is niet significant verschillend van 0,500 ( $P > 0,05$ ).



*Figuur 32: ROC-curve van de complexmetingen van de verhoogde CA153 stalen. AUC = Area Under Curve*

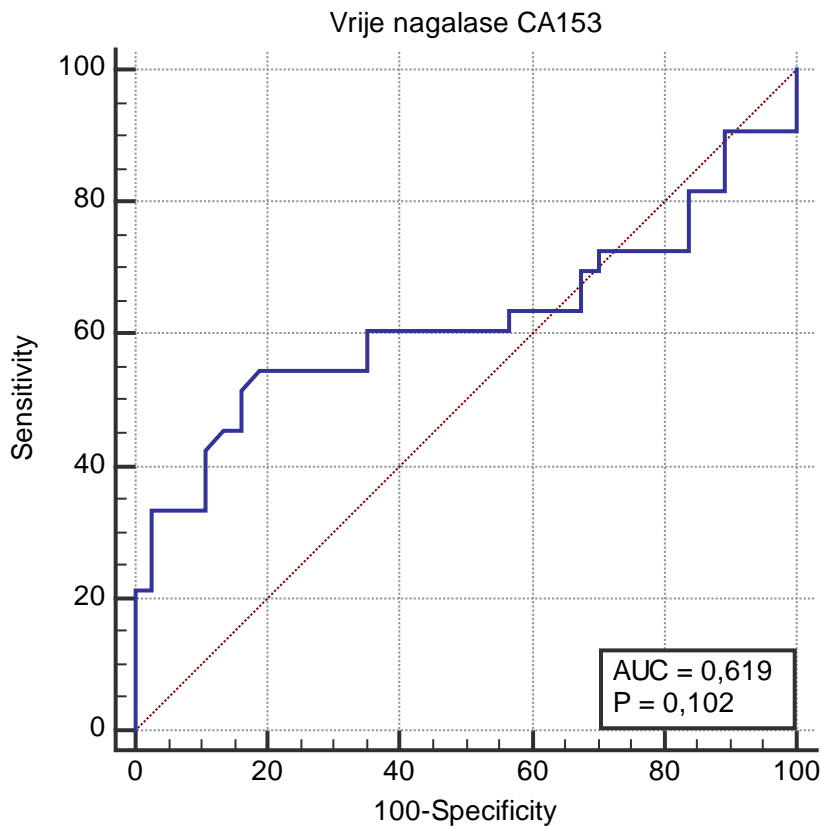
De box-plot in Figuur 33 vertoont een grote spreiding van complexmetingen van de stalen met verhoogde CA153. De mediaan van de normale controles van de complexmeting bedraagt 0,3991, de mediaan van de verhoogde CA153 stalen bedraagt 0,3400. De complexvorming is dus hoger bij de normale controle.



Figuur 33: Box-plot van de complexmetingen van de verhoogde CA153 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CA153 stalen

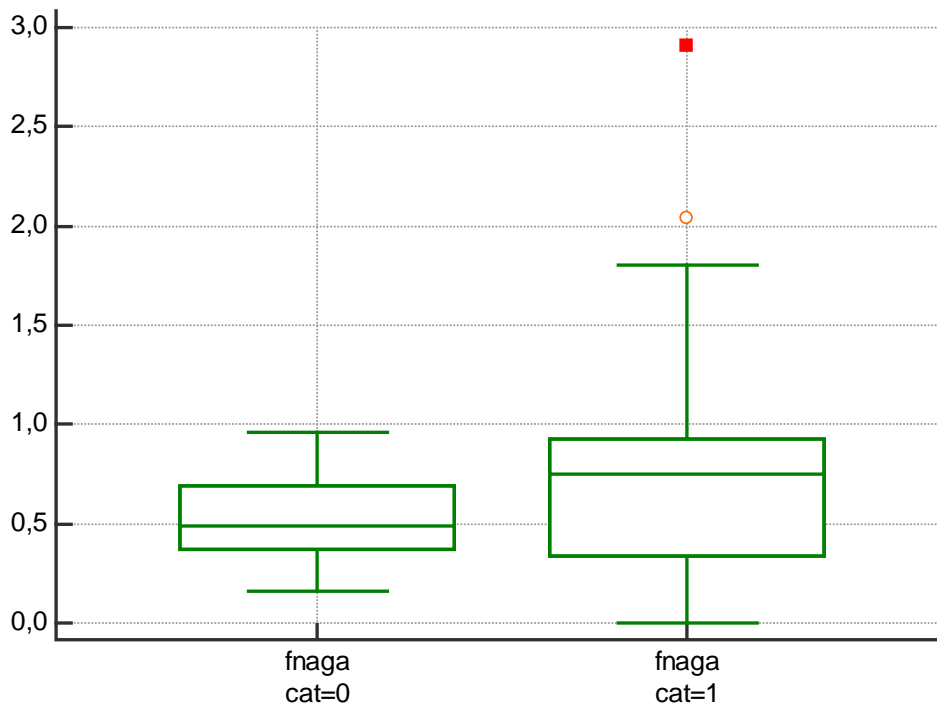
#### 6.2.3.2 Vrije nagalase

Ook de meting van vrije nagalase kan geen onderscheid maken tussen de normale controles en de stalen met verhoogde CA153. De AUC van deze test bedraagt 0,619 en is niet significant verschillend van 0,500 ( $P > 0,05$ ) (Figuur 34).



Figuur 34: ROC-curve van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CA153 stalen. AUC = Area Under Curve

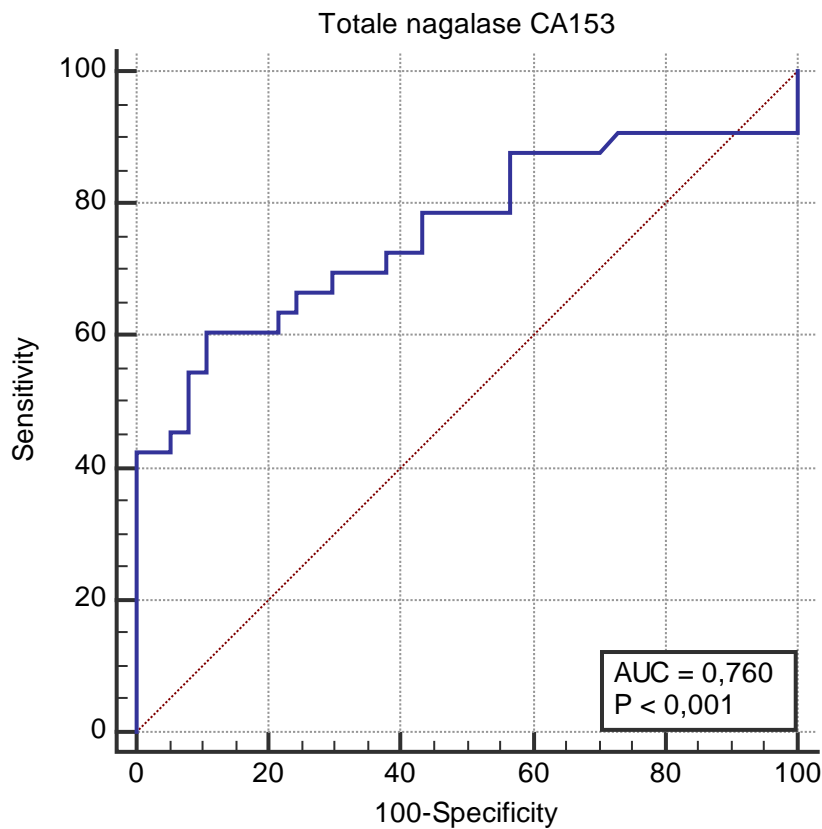
De medianen van de normale controles en de stalen met verhoogde CA153 liggen ver uit elkaar, nl. 0,4900 voor de normale controles en 0,8038 voor de verhoogde CA153 stalen (Figuur 35). De verhoogde CA153 stalen bevatten 2 uitschieters en een grote spreiding over de stalen.



Figuur 35: Box-plot van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CA153 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CA153 stalen

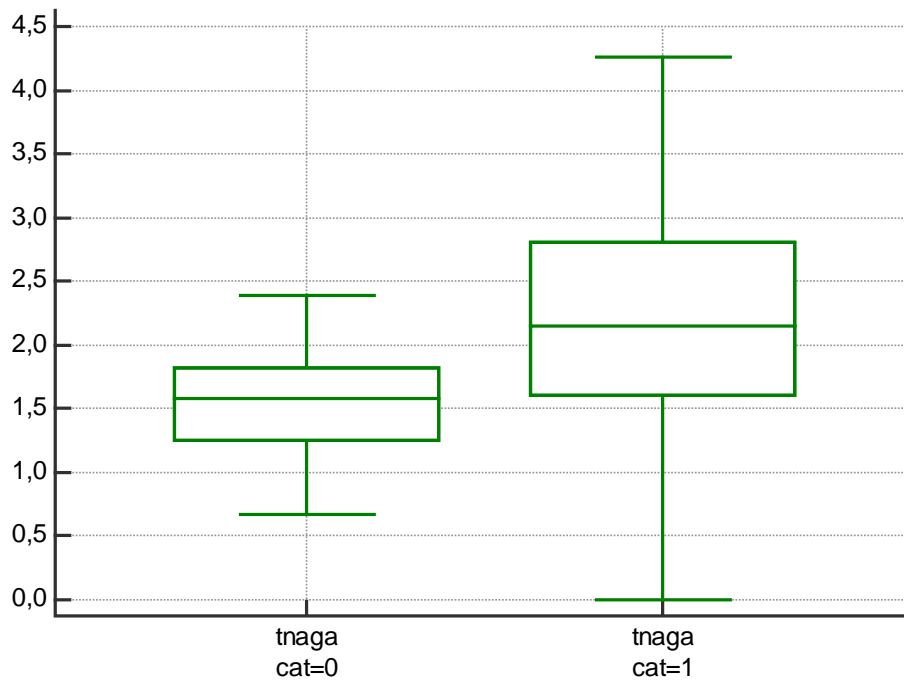
### 6.2.3.3 Totale nagalase

Door de totale nagalase te meten van de verhoogde CA153 stalen kan er een significant onderscheid gemaakt worden met de normale controles. De AUC-waarde is 0,760 en is significant verschillend van de kritische waarde 0,500 (Figuur 36).



*Figuur 36: ROC-curve van de totale nagalase-metingen van de verhoogde CA153 stalen. AUC = Area Under Curve*

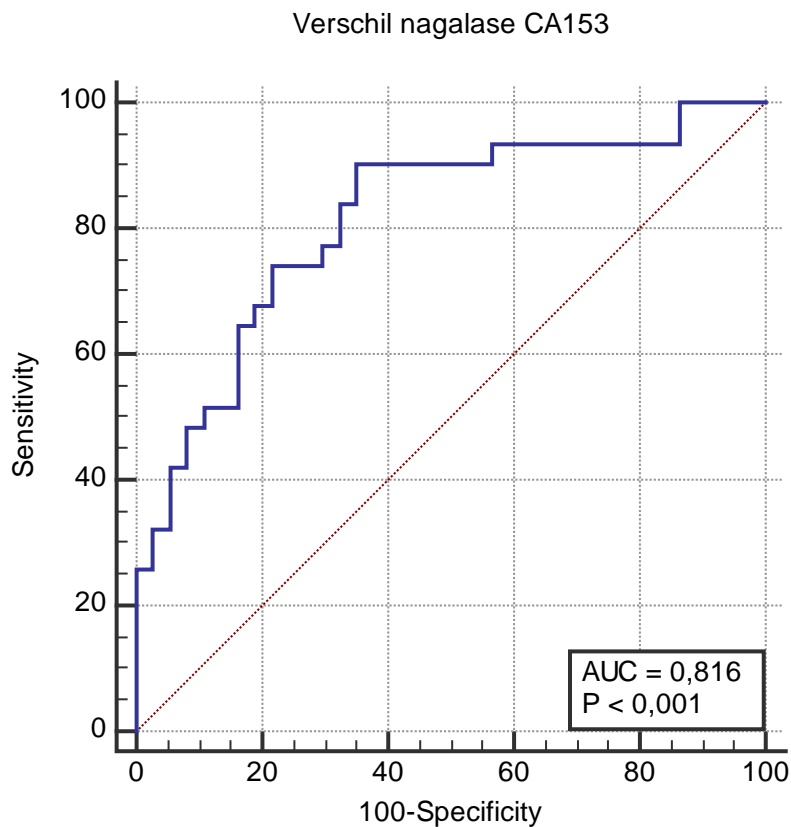
Op de box-plot in Figuur 37 is er een goed verschil te zien tussen de medianen van de normale controles en de verhoogde CA153 stalen voor totale nagalase. De normale controles hebben een mediaan van 1,5800 terwijl de stalen met verhoogde CA153 een mediaan van 2,1480 hebben. De stalen met verhoogde CA153 hebben dus meer totale nagalase dan de normale controles.



Figuur 37: Box-plot van de totale nagalase-metingen van de verhoogde CA153 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CA153 stalen

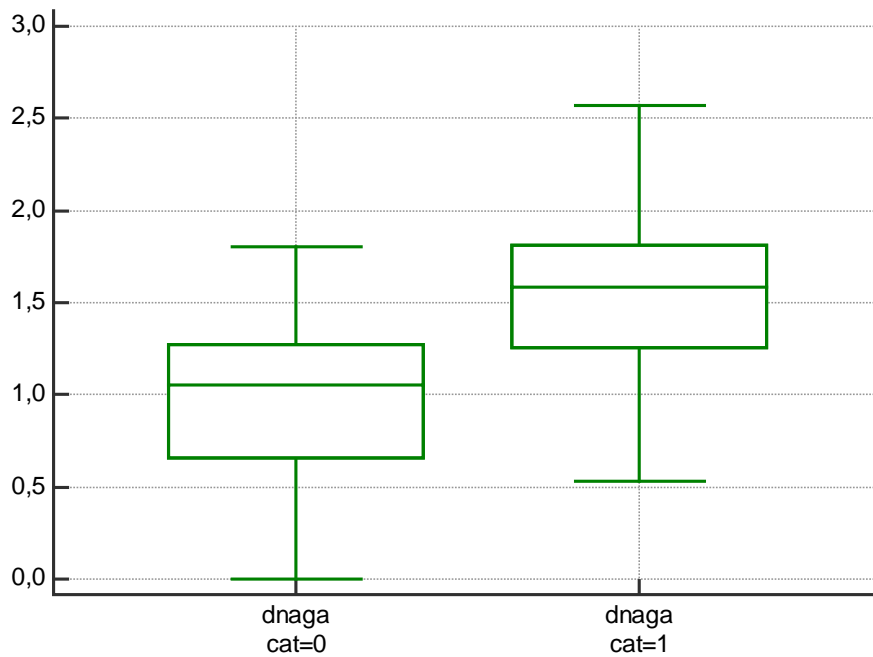
#### 6.2.3.4 Verschil nagalase

Ook bij de CA153 is het verschil in nagalase de beste methode om een onderscheid te maken tussen de normale controles en de verhoogde CA153 stalen. De ROC-curve (Figuur 38) toont een AUC-waarde van 0,816 welke significant verschillend is van 0,500 ( $P < 0,05$ ).



Figuur 38: ROC-curve van het verschil in nagalase van de verhoogde CA153 stalen. AUC = Area Under Curve

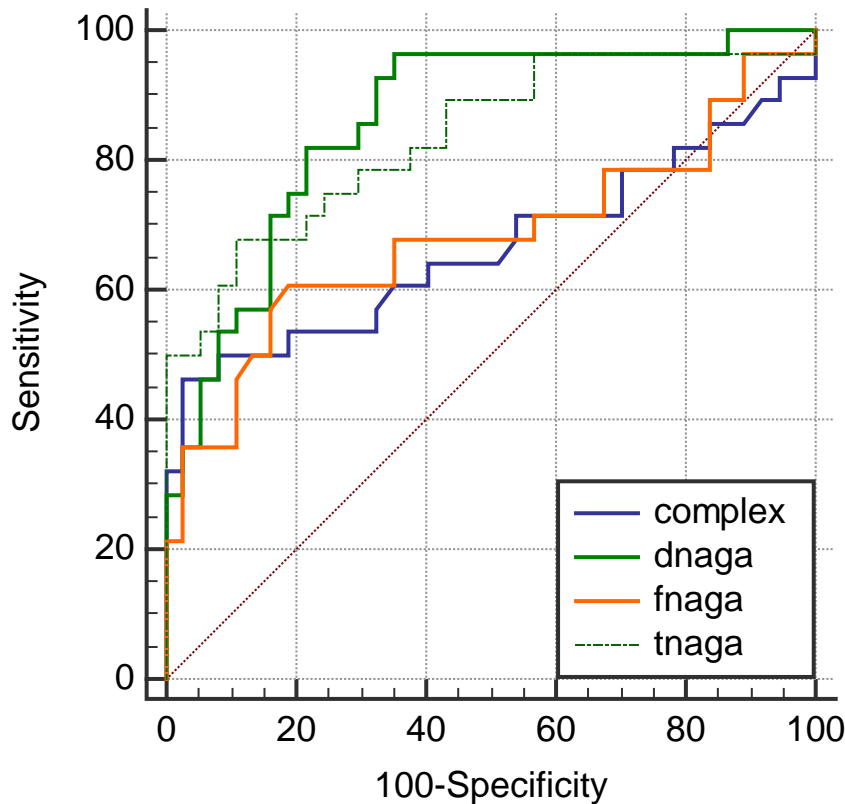
De box-plot in Figuur 39 toont dat de waarden tussen normale controles en de verhoogde CA153 stalen sterk verschillen. De mediaan van de normale controles voor het verschil in nagalase is 1,0500. Dit is lager dan de mediaan van de verhoogde CA153 stalen, welke 1,5820 bedraagt. Er is dus een groter verschil in nagalase bij de verhoogde CA153 stalen.



Figuur 39: Box-plot van het verschil in nagalase van de verhoogde CA153 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CA153 stalen

#### 6.2.3.5 Overzicht ROC-curves

Ook bij de verhoogde CA153 stalen kan het beste onderscheid gemaakt worden met de methode van het verschil in nagalase. Er kan geen onderscheid gemaakt worden op basis van de methode van vrije nagalase of van complexvorming. Een overzicht van alle ROC-curves is gegeven in Figuur 40.



Figuur 40: Overzicht van de verschillende ROC-curves voor de verhoogde CA153 stalen

Tabel 5: Overzicht van de gegevens van CA153

	Complex	fnaga	tnaga	dnaga
<b>AUC</b>	0,624	0,619	0,760	0,816
<b>P van AUC</b>	0,105	0,102	<0,001	<0,001
<b>Mediaan (CA153 stalen)</b>	0,3400	0,8038	2,1480	1,5820
<b>Mediaan (normale controles)</b>	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530

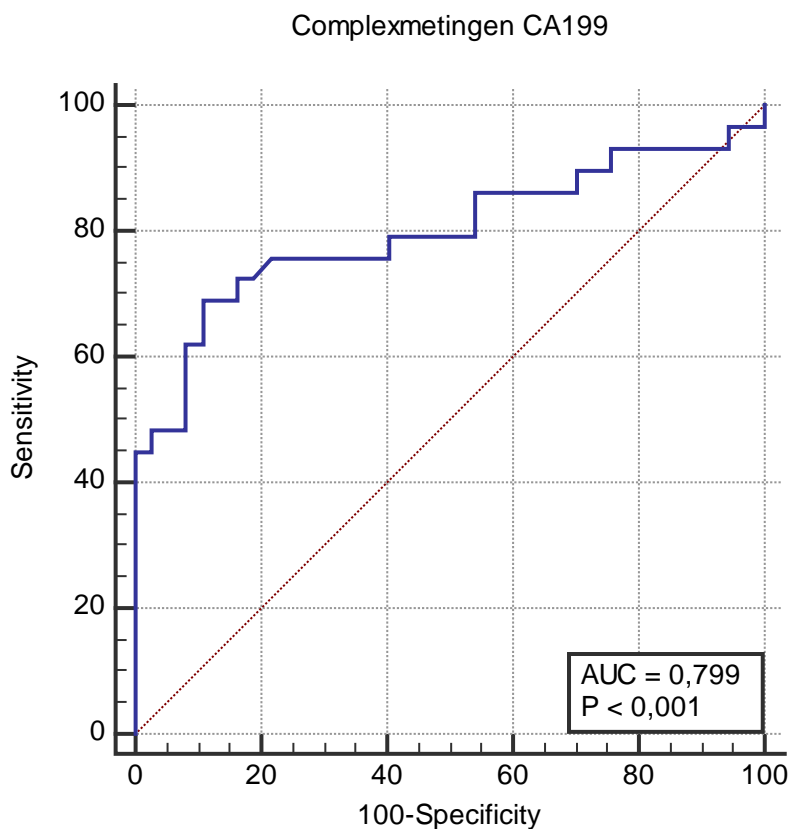
#### 6.2.4 CA199

De stalen met een verhoogde CA199 tumormerker worden vergeleken met de normale controles op basis van complexmeting, vrije nagalase, totale nagalase en verschil in nagalase. In totaal zijn er 29 stalen gemeten met verhoogde CA199.

##### 6.2.4.1 Complexmeting

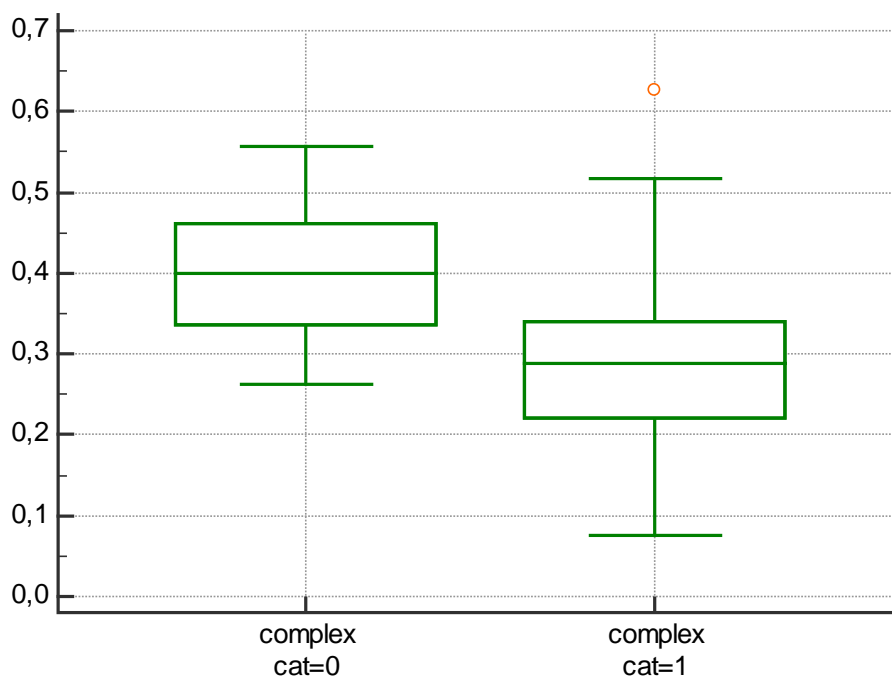
Met de complexmetingen kan een onderscheid gemaakt worden tussen de normale stalen en de stalen met verhoogde CA199. In Figuur 41 is te zien dat de AUC-waarde 0,799 bedraagt en significant verschillend is van 0,500 ( $P < 0,05$ ).





*Figuur 41: ROC-curve van de complexmetingen van de verhoogde CA199 stalen. AUC = Area Under Curve*

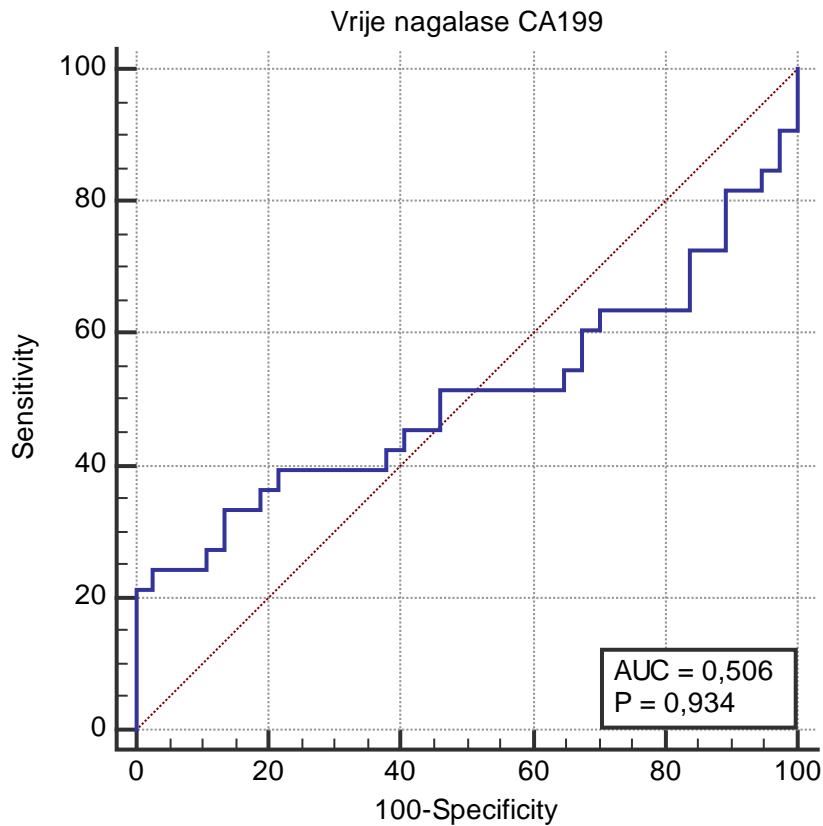
Ook in de box-plot is het verschil tussen de normale controles en de verhoogde CA199 stalen duidelijk (Figuur 42). De mediaan van de normale controles is 0,3990 en van de verhoogde CA199 stalen is 0,3011. Ook hier is de complexvorming lager bij de kankerstalen.



*Figuur 42: Box-plot van de complexmetingen van de verhoogde CA199 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CA199 stalen*

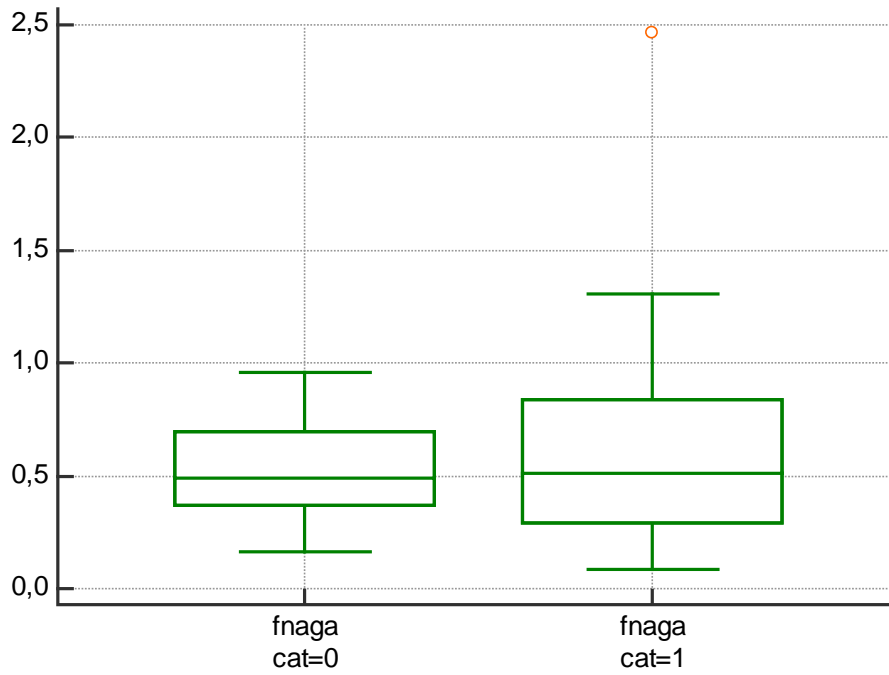
#### 6.2.4.2 Vrije nagalase

In de ROC-curve (Figuur 43) is het duidelijk dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de stalen met een verhoogde CA199 voor vrije nagalase. De AUC-waarde is namelijk 0,506 en is dus niet significant verschillend van 0,500 ( $P > 0,05$ ).



Figuur 43: ROC-curve van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CA199 stalen. AUC = Area Under Curve

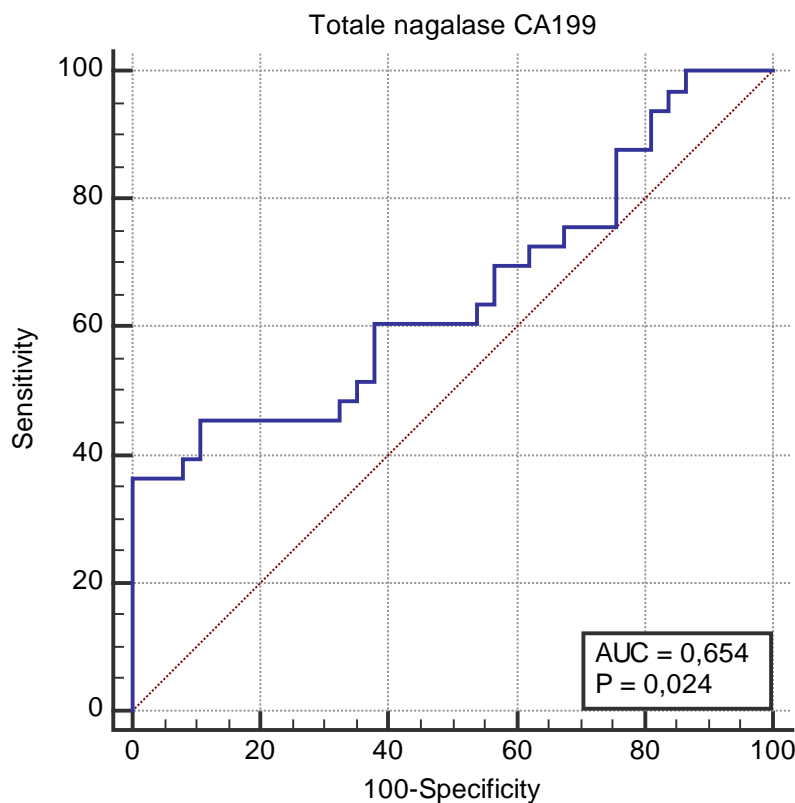
Dit is ook duidelijk in de box-plot waar de medianen van beide stalen dicht bij elkaar liggen, namelijk 0,4900 voor de normale controle en 0,5100 voor de stalen met verhoogde CA199 (Figuur 44).



Figuur 44: Box-plot van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CA199 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CA199 stalen

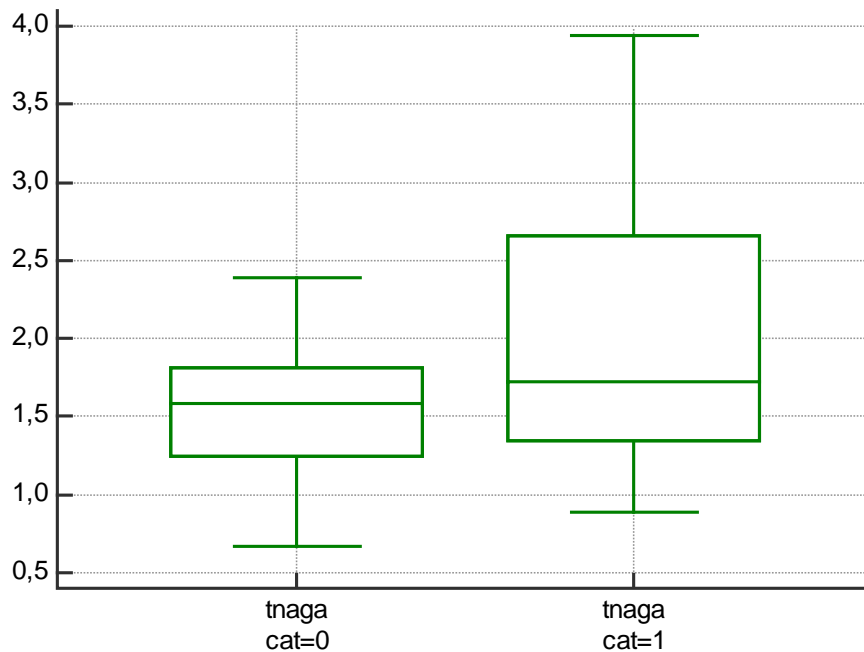
#### 6.2.4.3 Totale nagalase

Met de totale nagalase-metingen kan er wel een onderscheid gemaakt worden tussen de normale controles en de stalen met verhoogde CA199. De AUC-waarde voor totale nagalase is 0,654 en is significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ) (Figuur 45).



Figuur 45: ROC-curve van de totale nagalase-metingen van de verhoogde CA199 stalen. AUC = Area Under Curve

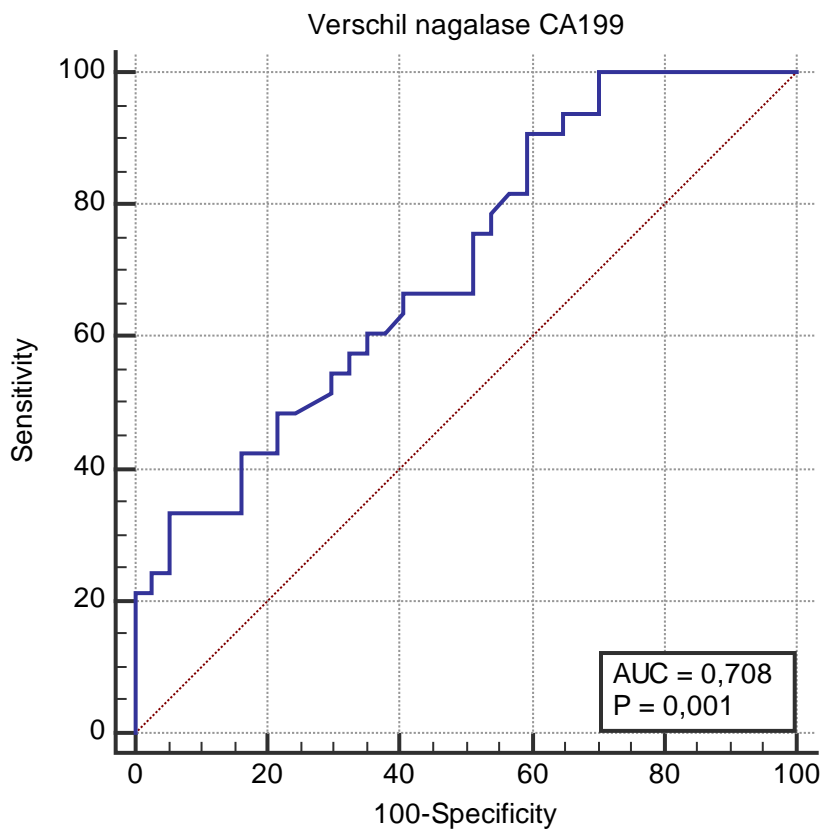
De box-plot in Figuur 46 toont dat er een grote spreiding is van de stalen met verhoogde CA199. De mediaan van de normale controle voor de totale nagalase is gelijk aan 1,5800 en ligt lager dan deze van de stalen met verhoogde CA199. De mediaan van deze laatste is 1,7190.



Figuur 46: Box-plot van de totale nagalase-metingen van de verhoogde CA199 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CA199 stalen

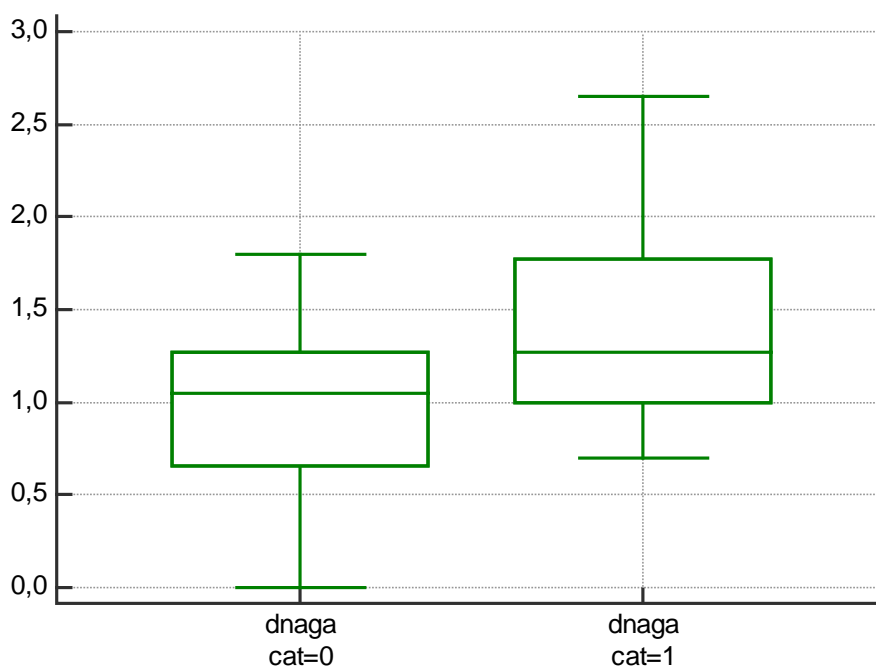
#### 6.2.4.4 Verschil nagalase

De ROC-curve in Figuur 47 van het verschil in nagalase toont aan dat er een onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de stalen met verhoogde CA199. De AUC is hier 0,708 en is significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ).



Figuur 47: ROC-curve van het verschil in nagalase van de verhoogde CA199 stalen. AUC = Area Under Curve

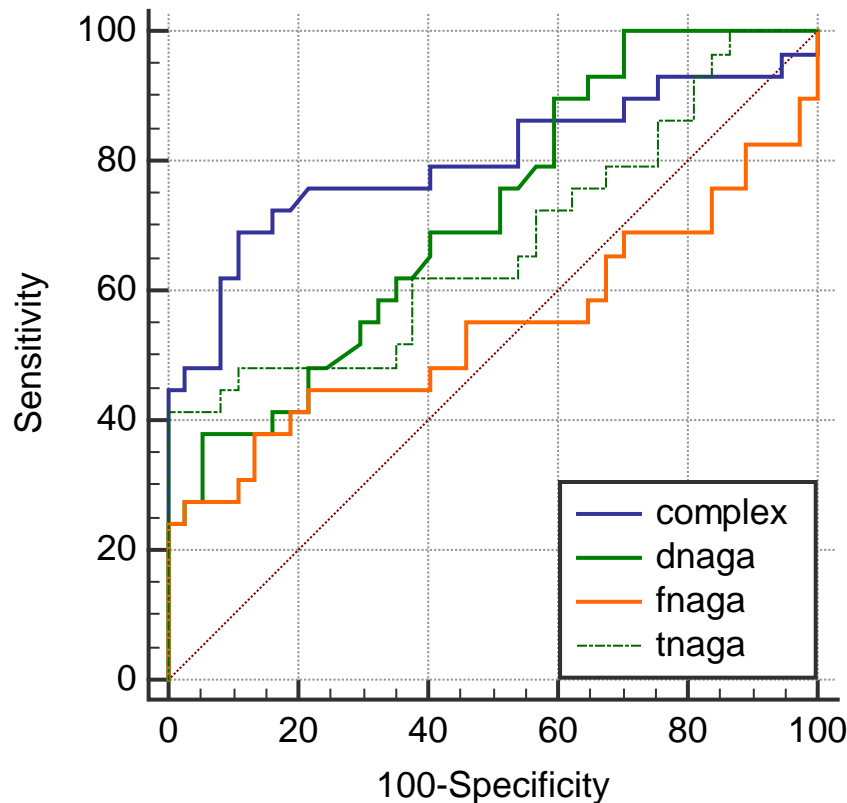
De box-plot (Figuur 48) geeft weer dat er een verschil is in de waarden van de normale controle en de stalen met een verhoogde CA199 voor het verschil in nagalase. De mediaan van de normale controle bedraagt 1,0500 en de mediaan van de verhoogde CA199 stalen is 1,2700. De stalen met verhoogde CA199 hebben dus een groter verschil in totale en vrije nagalase.



Figuur 48 Box-plot van het verschil in nagalase van de verhoogde CA199 stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CA199 stalen

### 6.2.4.5 Overzicht ROC-curves

In het overzicht weergegeven in Figuur 49 en Tabel 6 blijkt de complexmeting de beste methode om normale controles en stalen met verhoogde CA199 te onderscheiden van elkaar. Ook met het verschil in nagalase kan een onderscheid gemaakt worden.



Figuur 49: Overzicht van de verschillende ROC-curves voor de verhoogde CA199 stalen

Tabel 6: Overzicht van de gegevens van CA199

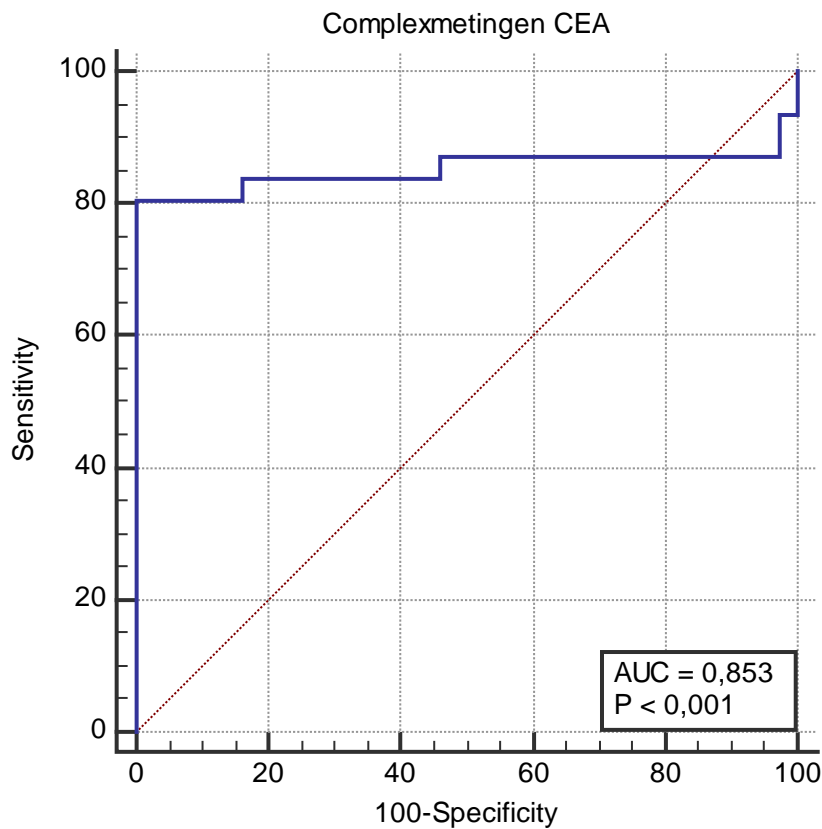
	Complex	fnaga	tnaga	dnaga
<b>AUC</b>	0,799	0,506	0,654	0,708
<b>P van AUC</b>	<0,001	0,934	0,024	0,001
<b>Mediaan (CA199 stalen)</b>	0,3011	0,5100	1,7190	1,2700
<b>Mediaan (normale controles)</b>	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530

### 6.2.5 CEA

Er zijn 31 stalen met hoge CEA waarden gemeten. Van deze stalen werden ROC-curves ten opzichte van de normale controle gemaakt en dit per meting, nl. complex, vrije nagalase, totale nagalase en verschil in nagalase. Per methode wordt ook de box-plot gegeven.

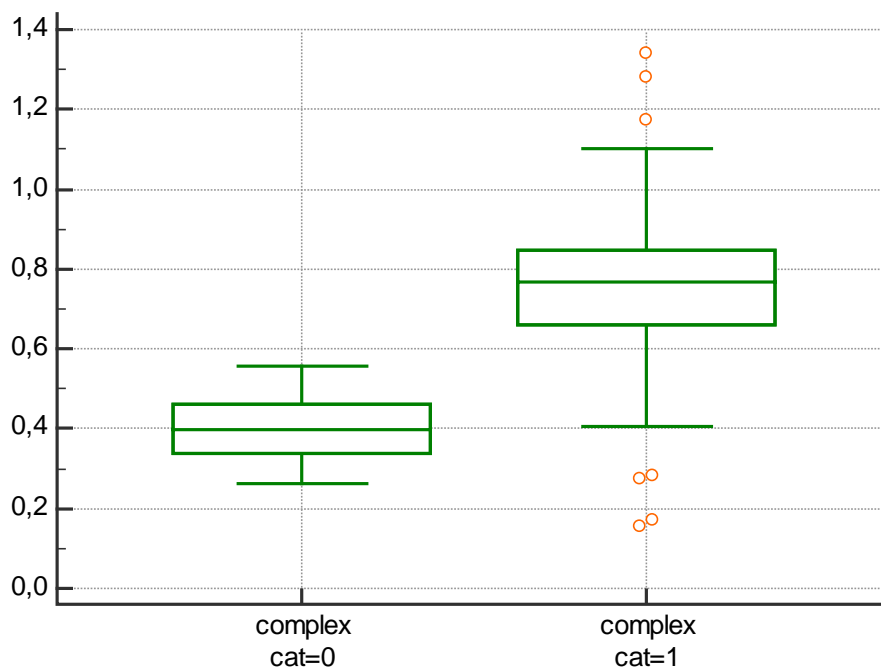
#### 6.2.5.1 Complexmeting

De ROC-curve van de complexmetingen toont aan dat er een significant verschil is tussen de metingen van normale controles en de stalen met verhoogde CEA (Figuur 50). De AUC is 0,853 en is significant groter dan 0,500 ( $P < 0,05$ ).



Figuur 50: ROC-curve van de complexmetingen van de verhoogde CEA stalen. AUC = Area Under Curve

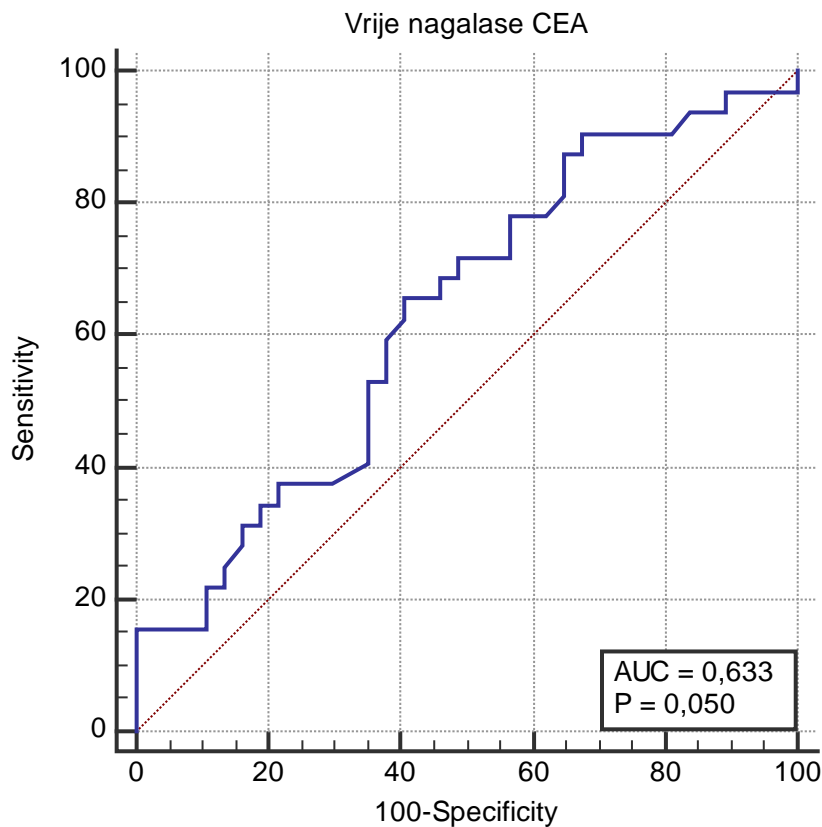
In de box-plot (Figuur 51) is een duidelijk verschil te zien tussen de normale controles en de stalen met verhoogde CEA waarden. De mediaan van de normale controles is 0,3990 in tegenstelling tot 0,7660 voor de verhoogde CEA stalen. Voor de CEA stalen is er dus een hogere complexvorming dan de normale controles. De stalen met verhoogde CEA heeft enkele uitschieters.



Figuur 51: Box-plot van de complexmetingen van de verhoogde CEA stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CEA stalen

### 6.2.5.2 Vrije nagalase

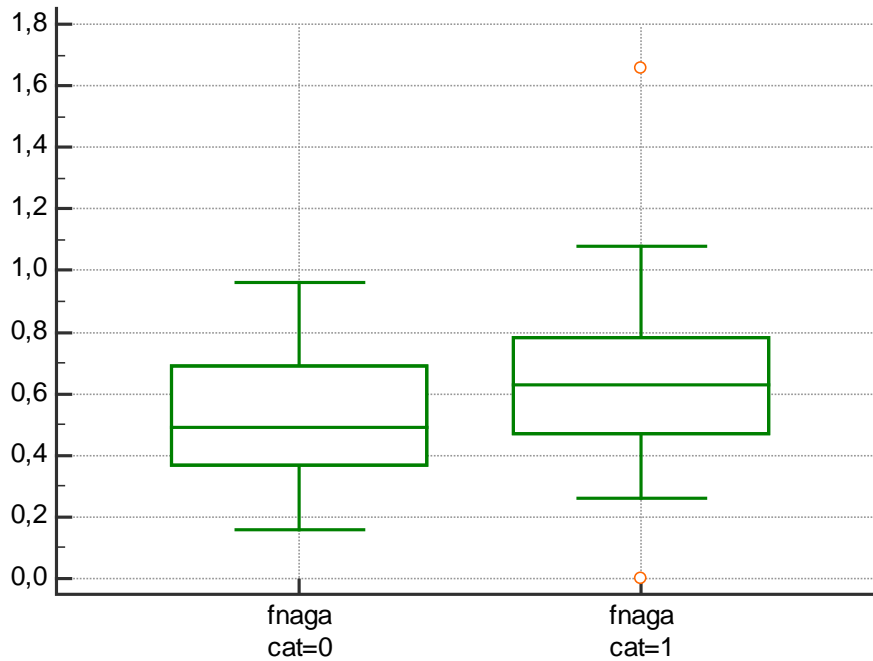
De ROC-curve van de vrije nagalase voor de verhoogde CEA stalen in Figuur 52 toont aan dat op basis van vrije nagalase er geen significant onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de verhoogde CEA stalen. De AUC is hier 0,633, maar het is niet significant verschillend van 0,500 ( $P=0,05$ ).



Figuur 52: ROC-curve van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CEA stalen. AUC = Area Under Curve

De box-plot (Figuur 53) toont aan dat de medianen niet ver uit elkaar liggen, nl. een mediaan van 0,4900 voor de normale controles en een mediaan van 0,6290 voor de stalen met verhoogde CEA. Op basis van de vrije nagalase kunnen stalen met verhoogde CEA niet herkend worden.

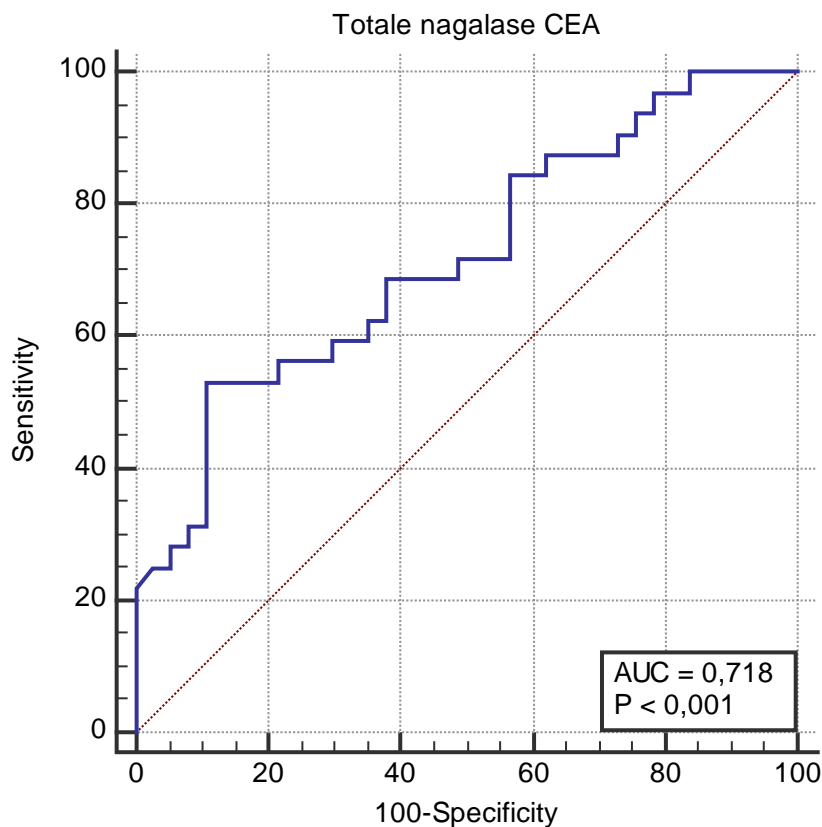




Figuur 53: Box-plot van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde CEA stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CEA stalen

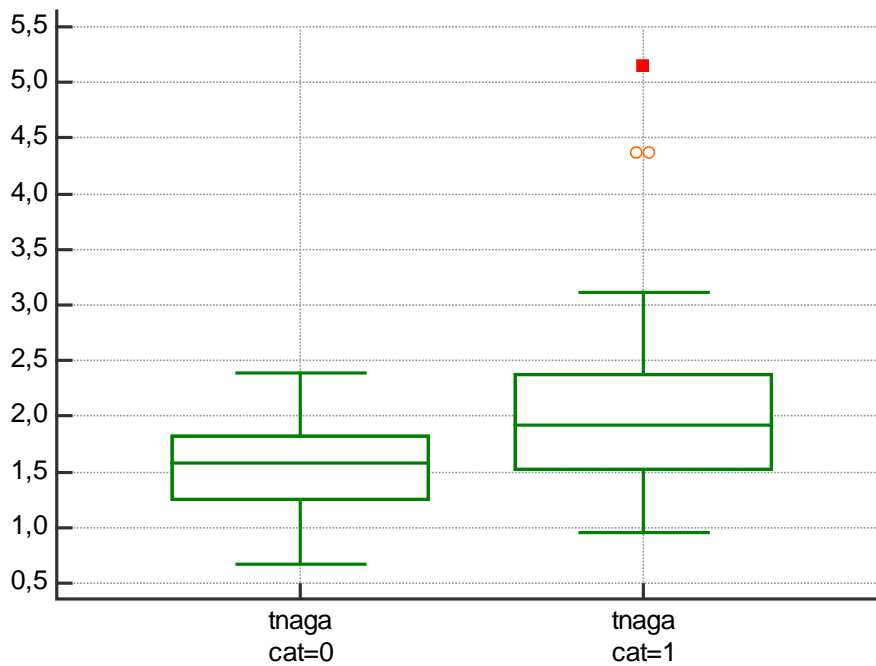
### 6.2.5.3 Totale nagalase

Op basis van de ROC-curve voor totale nagalase kan afgeleid worden dat er een onderscheid gemaakt kan worden tussen normale controles en stalen met verhoogde CEA (Figuur 54). De AUC is hier 0,718 en is significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ).



Figuur 54: ROC-curve van de totale nagalase-metingen van de verhoogde CEA stalen. AUC = Area Under Curve

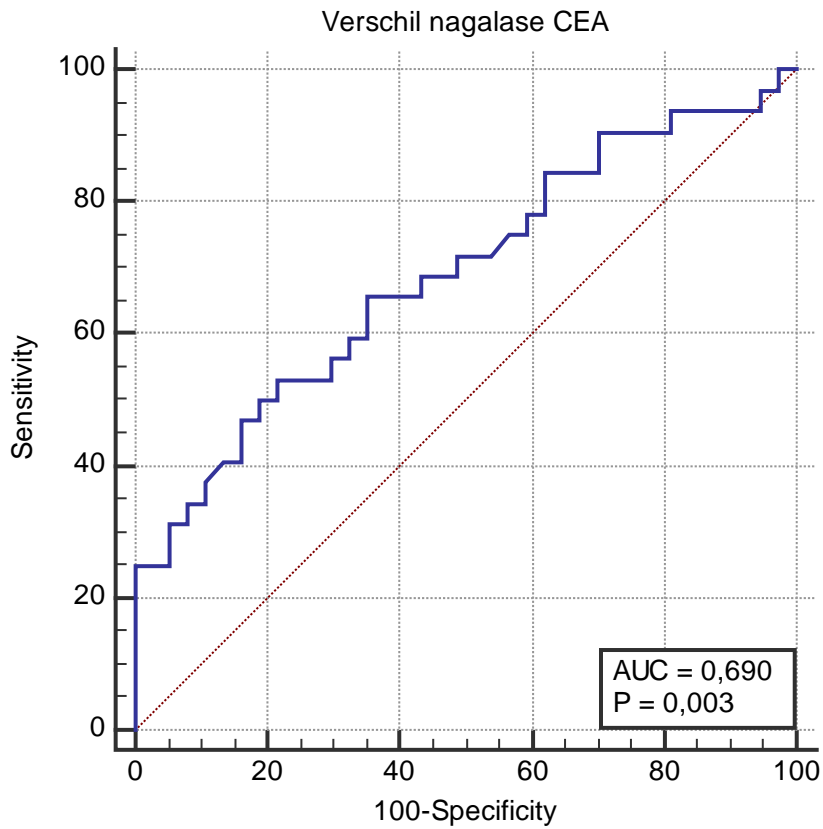
De box-plot in Figuur 55 toont aan dat er een duidelijk verschil is tussen de medianen. De normale controles hebben een mediaan van 1,5800 en de stalen met verhoogde CEA waarden hebben een mediaan van 1,9160. De verhoogde CEA stalen hebben enkele uitschieters.



Figuur 55: Box-plot van de totale nagalase-metingen van de verhoogde CEA stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CEA stalen

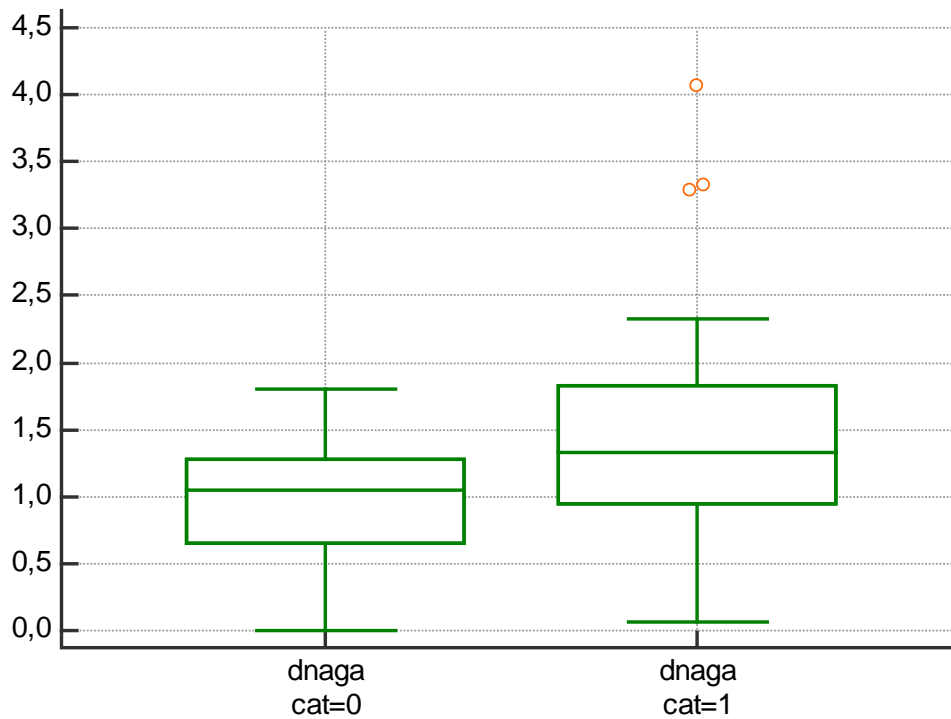
#### 6.2.5.4 Verschil nagalase

De ROC-curve voor het verschil in nagalase toont aan dat er een onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de stalen met verhoogde CEA (Figuur 56). De AUC is 0,690 en is significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ).



*Figuur 56: ROC-curve van verschil in nagalase van de verhoogde CEA stalen. AUC = Area Under Curve*

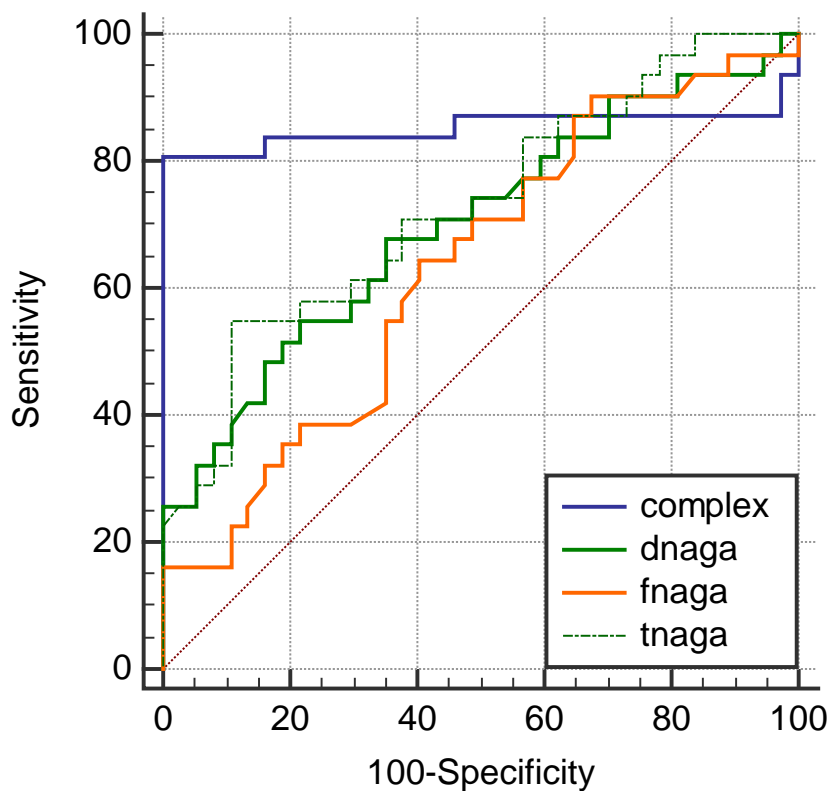
De medianen van de normale controles en stalen met verhoogde CEA zijn ook verschillend zoals te zien is in de box-plot in Figuur 57. De mediaan voor de normale controles voor verschil in nagalase is 1,0500 en voor de stalen met verhoogde CEA 1,3310. Het verschil in nagalase kan gebruikt worden om het onderscheid aan te tonen tussen normale controles en stalen met verhoogde CEA.



Figuur 57: Box-plot van verschil in nagalase van de verhoogde CEA stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": CEA stalen

#### 6.2.5.5 Overzicht ROC curves

De complexmeting is de beste methode om verhoogde CEA stalen te onderscheiden van normale controles. Verder kunnen de testen met totale nagalase en verschil in nagalase gebruikt worden om stalen aan te tonen met verhoogde CEA. In Figuur 58 en Tabel 7 wordt het overzicht van de verschillende ROC-curves weergegeven.



Figuur 58: Overzicht van de verschillende ROC-curves voor de verhoogde CEA stalen

Tabel 7: Overzicht van de gegevens van CEA

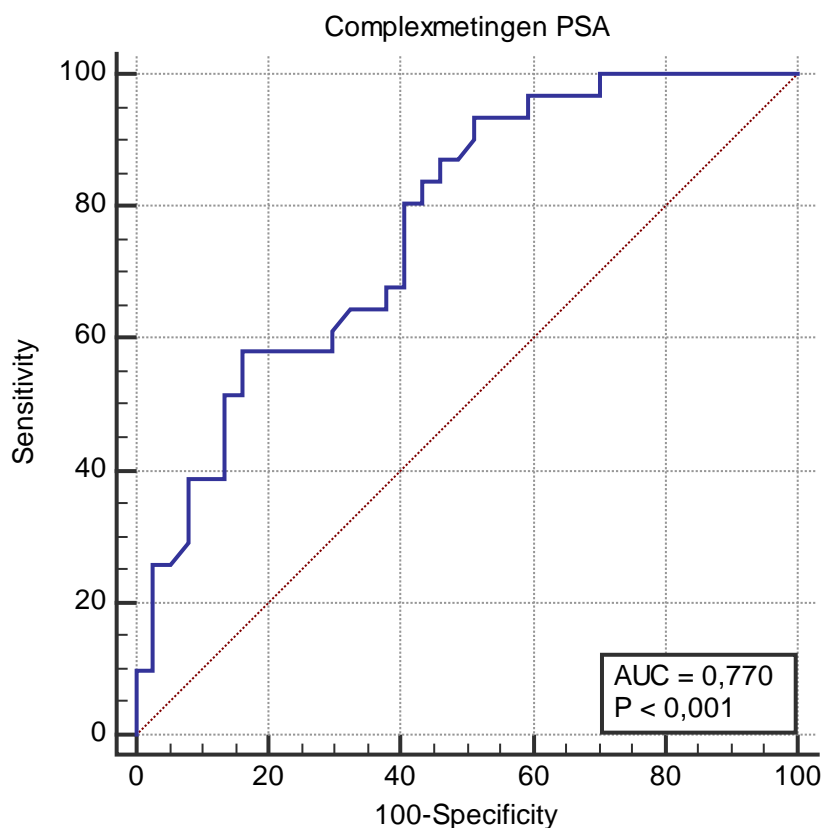
	Complex	fnaga	tnaga	dnaga
<b>AUC</b>	0,853	0,633	0,718	0,690
<b>P van AUC</b>	<0,001	0,050	<0,001	0,003
<b>Mediaan (CEA stalen)</b>	0,7660	0,6290	1,9160	1,3310
<b>Mediaan (normale controles)</b>	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530

### 6.2.6 PSA

Er werden ook nog 31 verhoogde PSA stalen vergeleken met de normale controles op de 4 metingen, nl. complex, vrije nagalase, totale nagalase en verschil in nagalase.

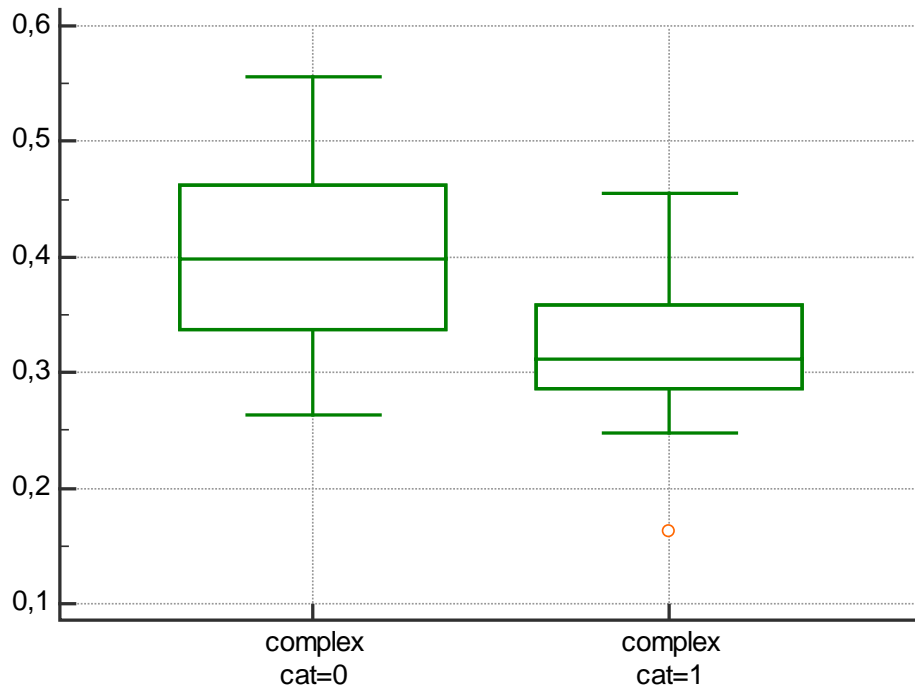
#### 6.2.6.1 Complexmeting

De ROC-curve in Figuur 59 toont aan dat er een onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de stalen met verhoogde PSA op basis van complexmetingen. De AUC is in dit geval 0,770 en is significant verschillend van 0,500.



Figuur 59: ROC-curve van de complexmetingen van de verhoogde PSA stalen. AUC = Area Under Curve

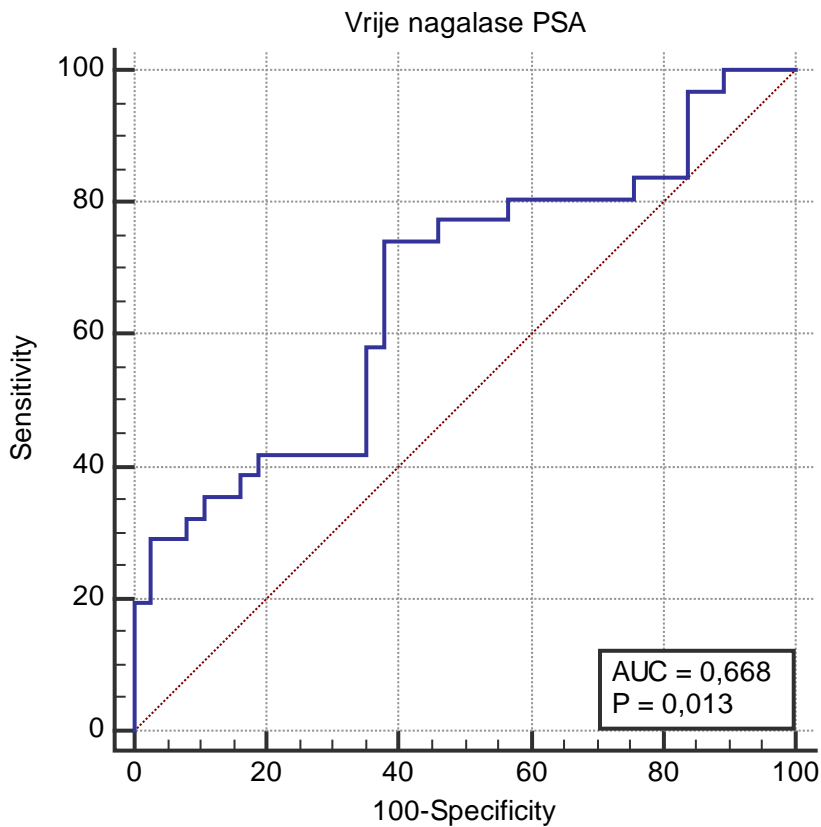
De box-plot laat zien dat de complexvorming bij normale controles hoger is dan de stalen met verhoogde PSA (Figuur 60). De mediaan van de complexvorming bij normale controles is 0,3990 en dit in tegenstelling tot de stalen met verhoogde PSA waar de mediaan 0,3110 bedraagt.



Figuur 60: Box-plot van de complexmetingen van de verhoogde PSA stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": PSA stalen

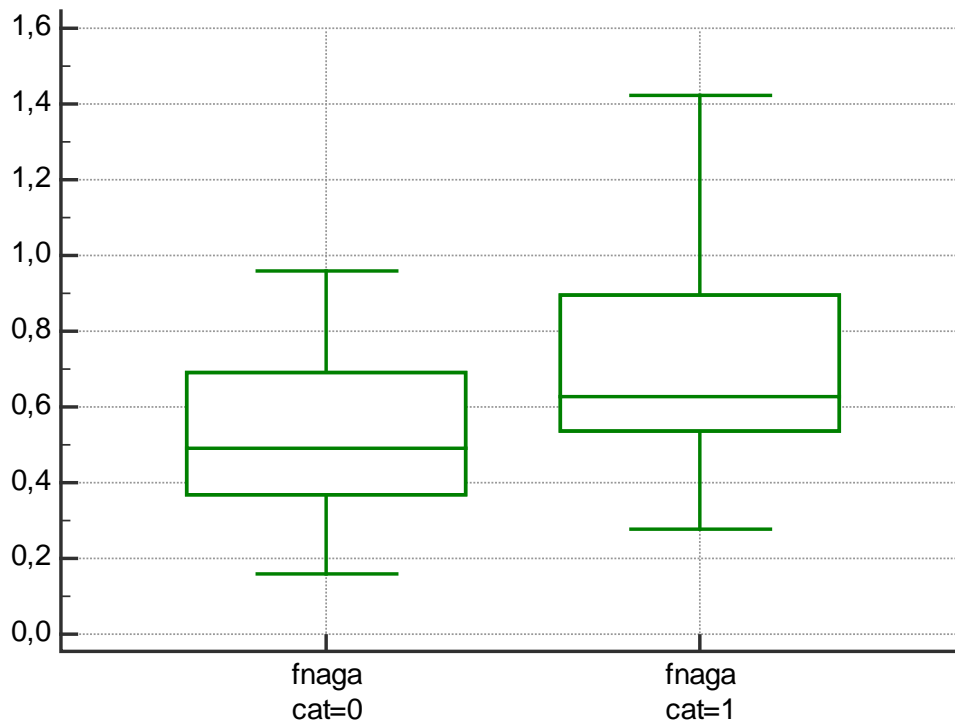
#### 6.2.6.2 Vrij nagalase

In de ROC-curve voor vrije nagalase in Figuur 61 blijkt dat ook uit deze meting het onderscheid gemaakt kan worden tussen normale controles en verhoogde PSA stalen. Ook hier is de AUC significant verschillend van 0,500 namelijk 0,668 ( $P < 0,05$ ).



Figuur 61: ROC-curve van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde PSA stalen. AUC = Area Under Curve

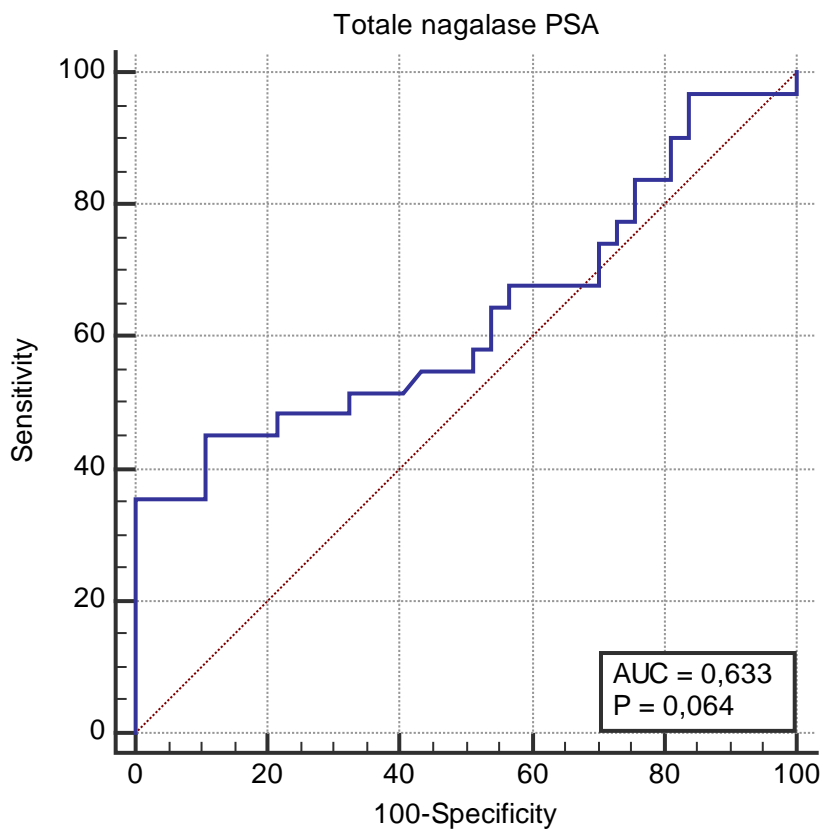
De box-plot laat zien dat er een gering verschil is tussen de 2 groepen (Figuur 62). De mediaan van de normale controles voor vrije nagalase is 0,4900 en deze van de stalen met verhoogde PSA is 0,6270. De normale controles hebben dus minder vrije nagalase dan de stalen met verhoogde PSA.



Figuur 62: Box-plot van de vrije nagalase-metingen van de verhoogde PSA stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": PSA stalen

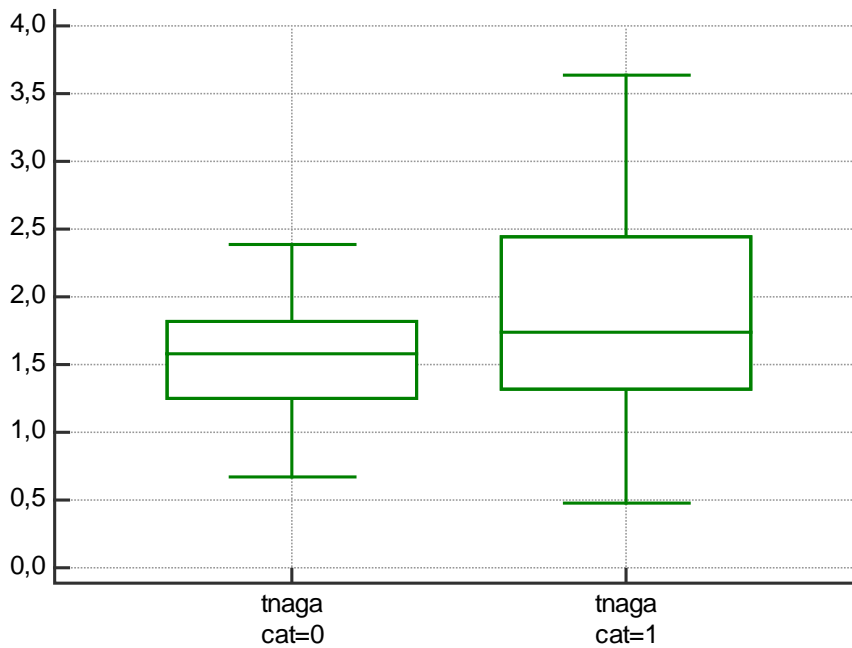
#### 6.2.6.3 Totaal nagalase

Uit de ROC-curve van de totale nagalase in Figuur 63 kan afgeleid worden dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen de normale controles en de stalen met verhoogde PSA. De AUC is hier 0,633 en is niet significant verschillend van 0,500 ( $P < 0,05$ ).



*Figuur 63: ROC-curve van de totale nagalase-metingen van de verhoogde PSA stalen. AUC = Area Under Curve*

De box-plot in Figuur 64 laat zien dat er maar een gering verschil is tussen beide groepen. De mediaan van de normale controles voor totale nagalase is 1,5800, de mediaan van de verhoogde PSA stalen is 1,7410.

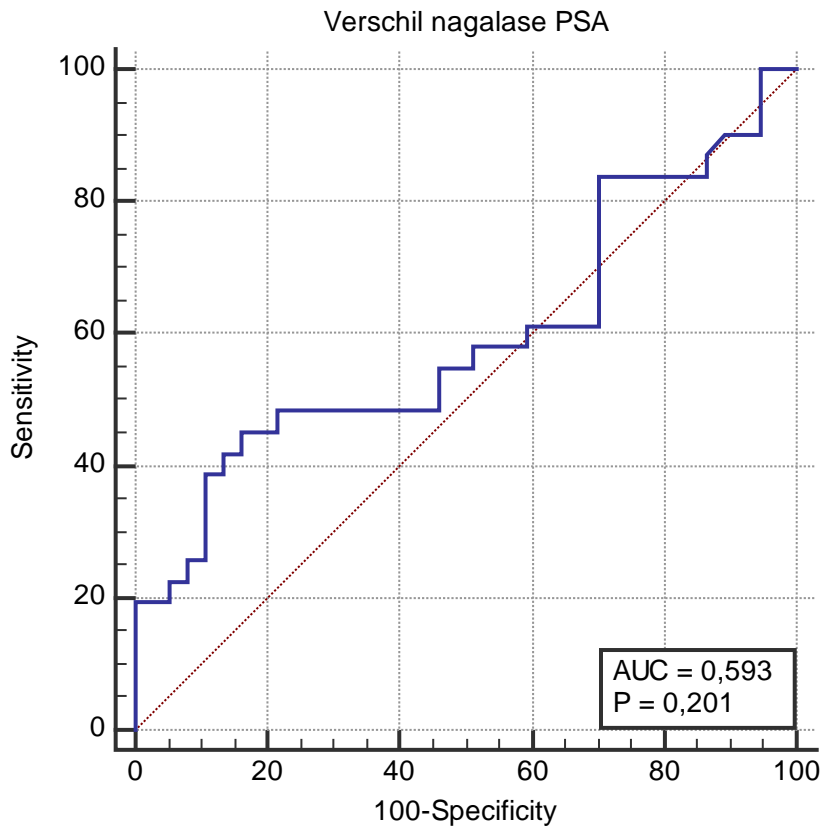


*Figuur 64: Box-plot van de totale nagalase-metingen van de verhoogde PSA stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": PSA stalen*



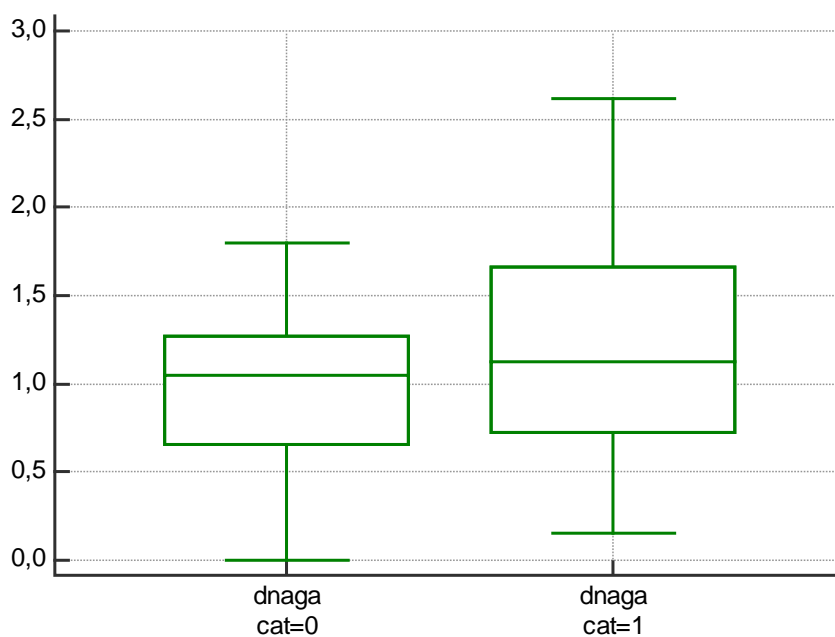
#### 6.2.6.4 Verschil nagalase

Het verschil in nagalase kan geen onderscheid maken tussen de 2 groepen volgens de ROC-curve. De AUC is slechts 0,593 en is niet significant verschillend van 0,500 ( $P > 0,05$ ) (Figuur 65).



Figuur 65: ROC-curve van het verschil in nagalase van de verhoogde PSA stalen. AUC = Area Under Curve

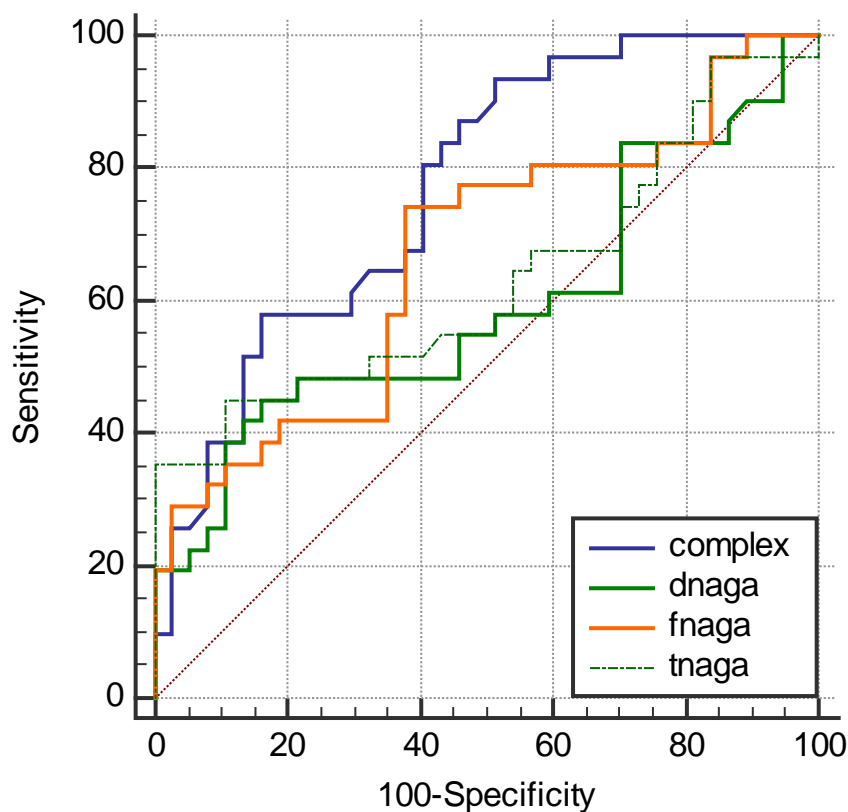
Uit de box-plot in Figuur 66 kan afgeleid worden dat het verschil tussen de 2 groepen gering is. De medianen verschillen weinig van elkaar, namelijk de mediaan voor de normale controle bedraagt 1,0530 en de mediaan voor de verhoogde PSA stalen bedraagt 1,1210.



Figuur 66: Box-plot van het verschil in nagalase van de verhoogde PSA stalen. "cat=0": gezonde stalen, "cat=1": PSA stalen

### 6.2.6.5 Overzicht van de ROC-curves

Uit de vergelijking van de ROC-curves in Figuur 67 blijkt dat de beste methode om een onderscheid te maken tussen de normale controles en de stalen met verhoogde PSA de complexmeting is. De andere mogelijkheid is de vrije nagalase, maar deze heeft een lagere AUC waarde dus zal er minder goed verschil te merken zijn tussen beide groepen. In Tabel 8 is een overzicht van de gegevens van de verhoogde PSA stalen gegeven.



Figuur 67: Overzicht van de verschillende ROC-curves voor de verhoogde PSA stalen

Tabel 8: Overzicht van de gegevens van PSA

	<b>Complex</b>	<b>fnaga</b>	<b>tnaga</b>	<b>dnaga</b>
<b>AUC</b>	0,770	0,668	0,664	0,593
<b>P van AUC</b>	<0,001	0,013	0,064	0,201
<b>Mediaan (PSA stalen)</b>	0,3110	0,6270	1,7410	1,1210
<b>Mediaan (normale controles)</b>	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530

### 6.3 Ratio ten opzichte van de mediaan

Voor een patiënt werden alle kankergerelateerde bloedwaarden opgevolgd in functie van de tijd. Hier wordt als voorbeeld de complexmeting omgerekend tot een verhouding van de gemeten waarde en de mediaan van de normale controles. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 9. De mediaan voor het complex van de normale controles is 0,399. De complexwaarden van de patiënt worden gedeeld door deze mediaan, zo wordt de ratio verkregen wat wordt weergegeven in de laatste kolom. Deze waarden worden uitgezet in functie van de tijd samen met de CEA-waarden van deze patiënten.

In Tabel 10 worden de percentielen van de ratio's van de complexmetingen voor de normale controles weergegeven. Hieruit worden percentielen 10 en 90 gehaald, deze zijn respectievelijk 0,7520 en 1,2350. Indien de ratiowaarden van de patiënt tussen beide percentielen liggen, wil dat zeggen dat deze waarden zoals de normale controles zijn. Indien de waarden erbuiten liggen betekent dit ze afwijken van de normale controles.

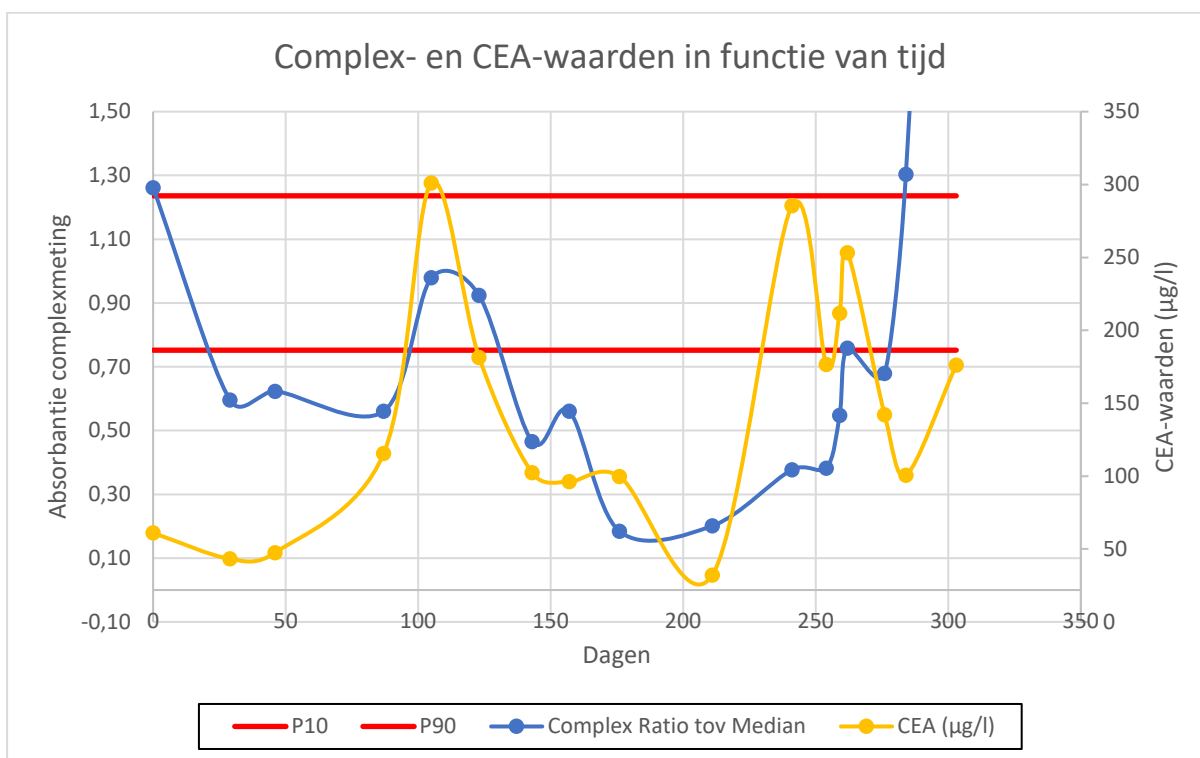
*Tabel 9: Gegevens van patiënt opgevolgd in tijd (fnaga, tnaga en dnaga zijn weergegeven in nmol/min.ml)*

dagen	fnaga	tnaga	dnaga	Complex (absorbantie)	CEA (µg/l)	Ratio complex
303	0,76	1,59	0,83	1,76	176,2	4,40
284	0,90	1,68	0,78	0,52	100,5	1,30
276	1,20	2,69	1,50	0,27	142	0,68
262	1,30	2,76	1,46	0,30	253,3	0,76
259	3,34	6,51	3,18	0,22	211,8	0,55
254	1,02	2,24	1,22	0,15	176,5	0,38
241	1,23	2,64	1,41	0,15	285,4	0,38
211	1,08	2,21	1,13	0,08	32,2	0,20
176	1,32	3,09	1,77	0,07	99,7	0,18
157	0,74	1,76	1,02	0,22	96,2	0,56
143	0,60	1,21	0,62	0,19	102,3	0,47
123	0,78	1,99	1,20	0,37	181,5	0,92
105	0,66	1,79	1,13	0,39	301	0,98
87	0,75	1,58	0,82	0,22	115,6	0,56
46	0,75	1,58	0,83	0,25	47,5	0,62
29	0,82	2,01	1,19	0,24	43,2	0,60
0	3,03	2,61	-0,41	0,50	61	1,26

Tabel 10: Percentielen van de ratio's van de complexmetingen voor de normale controles

Percentiles	Ratio	95% Confidence interval
2,5	0,6855	
5	0,7200	
10	0,7520	0,6659 tot 0,8309
25	0,8400	0,7588 tot 0,8932
75	1,1525	1,0968 tot 1,2224
90	1,2360	1,1782 tot 1,3821
95	1,2925	
97,5	1,3560	

In Figuur 68 worden de berekende ratio's van de complexmetingen uitgezet in functie van de tijd samen met de CEA-waarden. In deze grafiek zijn ook de 10% en 90% percentielen voor de complexratio's weergegeven. Hierbij is te zien dat de oorspronkelijke complexratio boven het 90 percentiel zit en vervolgens onder het 10 percentiel gaat. Het is duidelijk dat de waarde van de patiënt afwijkt voor het grootste deel van het tijdsverloop, namelijk onder het 10 percentiel. De complexratio's volgen grotendeels de CEA-waarden, namelijk waar een piek is bij de CEA-waarden is ook een piek te zien bij de complexratio's.



Figuur 68: Complexratio's en CEA-waarden in functie van de tijd. P10 is het 10 percentiel en P90 is het 90 percentiel



## 7 Discussie

### 7.1 Complexmeting

Bij de stalen met verhoogde CA125, CA153, CA199 en PSA is er een lagere mediaan voor complexvorming dan bij de normale controles. Maar alleen bij CA125, CA199 en PSA is de complexvorming significant verschillend van de normale controles. De stalen met verhoogde CEA volgen daarentegen wel de vooropgestelde hypothese dat complexvorming hoger zal zijn bij kankerstalen. Dit verschil is ook statistisch significant (Tabel 11).

Een mogelijke verklaring voor een lagere complexvorming van nagalase met DBP-MAF is dat nagalase niet enkel het nagalase-DBP-MAF complex gaat vormen maar dat er ook nog andere stoffen in het bloed een complex vormen met dit enzym. Deze stoffen moeten dan afkomstig zijn van de kankercellen. Zo zullen de tumormerkers een mogelijke binding aangaan met nagalase en een complex vormen. Deze bevatten immers ook een O-gebonden N-acetylgalactosamine [53]. De merkers CA125, CA153, CA199 en PSA zouden in dat geval dus kunnen complexeren met nagalase. Uitgaande van deze resultaten zou nagalase dan ook niet binden met de CEA merker. Dit kan zijn omdat deze merker geen GalNAc bezit of dat deze niet bereikbaar is voor nagalase vanwege sterische hinder.

### 7.2 Vrije nagalase

De meting van de vrije nagalase blijkt geen goede methode te zijn om kankerstalen te onderscheiden van de normale controles. Enkel voor PSA was het verschil statistisch significant. Er werd ook niet verwacht dat er op basis van vrije nagalase een verschil kon gemaakt worden tussen de stalen aangezien nagalase ook als complex aanwezig is het bloed.

### 7.3 Totale nagalase

De meting van totale nagalase geeft al meer de mogelijkheid om normale controles en kankerstalen te onderscheiden van elkaar. Enkel stalen met verhoogde PSA geven hier geen gewenste resultaten. Bij alle andere tumormerkers is er wel een significant verschil te zien waarbij de kankerstalen altijd een hogere totale activiteit van nagalase vertonen. Dit wil zeggen dat er voor deze stalen meer nagalase voorkomt in de vrije en gecomplexeerde vorm samen.

### 7.4 Verschil in nagalase

Het verschil in nagalase is de beste methode om een onderscheid te maken tussen gezonde stalen en kankerstalen. Voor 4 van de 5 tumormerkers bleek er een verhoogde activiteit te zijn van nagalase, enkel bij de verhoogde PSA stalen is er geen significant verschil tussen beide groepen. Dit wil dus zeggen dat bij de andere met tumormerker verhoogde stalen meer nagalase is vrijgekomen van complexen in tegenstelling tot de normale controles. Het verschil in nagalase is dus een maat voor de hoeveelheid nagalase die gecomplexeed was aan DBP-MAF in het bloed.

Tabel 11: Overzicht van de gegevens van alle kankerstalen

		<b>Complex</b>	<b>fnaga</b>	<b>tnaga</b>	<b>dnaga</b>
<b>CA125</b>	AUC	0,757	0,627	0,803	0,837
	P van AUC	<0,001	0,077	<0,001	<0,001
	Mediaan	0,3110	0,7015	2,0395	1,5600
	Mediaan NC	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530
<b>CA153</b>	AUC	0,624	0,619	0,760	0,816
	P van AUC	0,105	0,102	<0,001	<0,001
	Mediaan	0,3400	0,8038	2,1480	1,5820
	Mediaan NC	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530
<b>CA199</b>	AUC	0,799	0,506	0,654	0,708
	P van AUC	<0,001	0,934	0,024	0,001
	Mediaan	0,3011	0,5100	1,7190	1,2700
	Mediaan NC	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530
<b>CEA</b>	AUC	0,853	0,633	0,718	0,690
	P van AUC	<0,001	0,050	<0,001	0,003
	Mediaan	0,7660	0,6290	1,9160	1,3310
	Mediaan NC	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530
<b>PSA</b>	AUC	0,770	0,668	0,664	0,593
	P van AUC	<0,001	0,013	0,064	0,201
	Mediaan	0,3110	0,6270	1,7410	1,1210
	Mediaan NC	0,3990	0,4900	1,5800	1,0530

### 7.5 Ratio ten opzichte van de mediaan

Uit de complexratio's kan het ziekteverloop ook opgevolgd worden. Het blijkt zelfs dat iedere keer voor dat de CEA-waarden omhoog gaan, de complexwaarden laag zijn. De verlaagde complexratio's kunnen dus mogelijks een aanwijzing geven voor een toekomstige stijging van de CEA-waarden.

## 8 Conclusie

Uit de resultaten van de sandwich ELISA volgt dat het complex bestaat en aangetoond kan worden. De signalen van de verdunning zijn echter laag, wat wijst op een lage initiële concentratie van het complex in het bloed. Daarom moet het staal onverdund gemeten worden.

De resultaten van alle gemeten stalen tonen aan dat er minder complex aanwezig is in de kankerstalen. De hypothese dat er meer complexvorming is in kankerstalen wordt hier dus tegengesproken. De totale nagalaseactiviteit en het verschil in nagalaseactiviteit is wel hoger bij kankerstalen. Met dit laatste wordt het verschil bedoeld in nagalaseactiviteit na en voor de dissociatie van het complex (van nagalase aan DBP-MAF) en die is dan gelijk aan de activiteit van de nagalasefractie die oorspronkelijk was gebonden aan het complex. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat nagalase niet enkel een complex zal vormen met DBP-MAF maar ook met andere tumorgesecreteerde stoffen. Dit verklaart de lagere hoeveelheid aan nagalase-DBP-MAF-complex, de verhoogde vrije nagalaseactiviteit en verhoogd verschil in nagalaseactiviteit. De andere stoffen waarmee nagalase zou kunnen complexeren, kunnen de tumormerkers zijn. Uit de resultaten van de tumormerkers blijkt echter dat voor de verhoogde CEA stalen wel een hogere concentratie complex aanwezig is. Dit zou betekenen dat de CEA merker geen complex kan vormen met nagalase. Het is geweten dat nagalase bindt aan GalNAc. De structuren van de tumormerkers moeten onderzocht worden of in hun structuur deze GalNAc aanwezig is. Dit kan deze hypothese ondersteunen.

Op basis van de resultaten van de verschillende tumormerkers blijken de metingen met complex en het verschil in nagalaseactiviteit de beste methoden om een onderscheid te maken tussen kankerstalen en normale controles. Met de complexmeting kunnen bij vier van de vijf merkers een onderscheid aangetoond worden. Er moet wel gezegd worden dat CEA ook een van deze vier merkers is. Bij deze merker zullen de waarden voor complex hoger liggen dan de normale in tegenstelling tot de andere drie merkers die minder complexvorming hebben dan de normale controles. Het verschil in nagalaseactiviteit is daarom de geprefereerde keuze om een onderscheid te maken tussen kankerstalen en normale controles. Ook hier zijn de resultaten positief voor vier van de vijf merkers, maar bij deze methode zijn de waarden van de kankerstalen allemaal hoger dan de normale controle in tegenstelling tot de complexmeting.

De meting met verschil in nagalase is dus geen algemene tumormerker aangezien de verhoogde PSA stalen niet onderscheiden kunnen worden op deze manier. Het is echter wel een goede methode om een eerste screening te doen en de overige vier merkers uit te sluiten.





## Verder onderzoek

In dit onderzoek werd aangetoond dat er met behulp van complex- en nagalasemetingen een onderscheid gemaakt wordt tussen vier van de vijf tumormerkers. Het is dus nuttig om dit onderzoek uit te breiden naar alle gekende tumormerkers zodat er vergeleken kan worden met alle soorten kankers. De combinatie van de nagalaseactiviteits- en complexmetingen kunnen samen een goede indicatie zijn voor de aanwezigheid van een tumor. Ook dit moet echter nog verder onderzocht worden.

Momenteel werden ongeveer 40 stalen per merker getest, daarom moet dit onderzoek verder uitgebreid worden naar grotere steekproeven om de significantie van de resultaten te verhogen.

Het zal ook nuttig zijn om de bloedwaarden van meerdere patiënten op te volgen in functie van tijd om het effect van de behandeling te bepalen. Voorlopig werd slechts één patiënt gevolgd in functie van de tijd.



## Bibliografie

- [1] G. Makowsky, *Advances in Clinical Chemistry*, San Diego: Elsevier Science Publishing, 2014.
- [2] National Cancer Institute, „Cancer Statistics,” 22 april 2018. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>. [Geopend 24 maart 2019].
- [3] N. Yamamoto en V. Naraparaju, „Vitamin D3-Binding Protein as a Precursor for Macrophage Activating Factor in the Inflammation-Primed Macrophage Activation Cascade in Rats,” *Cellular Immunology*, nr. 170-2, pp. 161-167, 1996.
- [4] N. Yamamoto en R. Kumashirto, „Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, September 1, 1993, Vol.151(5), pp.2794-2802, nr. 151-5, pp. 2794-2802, 1993.
- [5] N. E. Clark en S. C. Garman, „The 1.9 Å Structure of Human  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase,” *J. Mol. Biol.*, nr. 393, pp. 435-447, 2009.
- [6] N. Yamamoto en V. Naraparaju, „Prognostic Utility of Serum  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase and Immunosuppression Resulted from Deglycosylation of Serum Gc Protein in Oral Cancer Patients,” *Cancer Research*, nr. 57-2, pp. 295-299, 1997.
- [7] H. Nagasawa, Y. Uto, H. Sasaki, N. Okamura, A. Murakami, S. Kubo, K. L. Kirk en H. Hori, „Gc protein (Vitamin D-binding protein): Gc Genotyping and GcMAF Precursor Activity,” *Anticancer Research*, 2005 Nov-Dec, Vol.25(6A), pp.3689-3695, nr. 25-6A, pp. 3689-3695, 2005.
- [8] D. Rehder, R. Nelson en C. Borges, „Glycosylation status of vitamin D bindingprotein in cancer patients,” *Protein Science*, nr. 18-10, pp. 2036-2042, 2009.
- [9] J. Owen, J. Punt en S. Stranford, *Kuby Immunology*, New York: W.H.Freeman & Co Ltd, 2013.
- [10] L. Rejnmark, A. Lauridsen, P. Vestergaard, L. Heickendorff, F. Andreasen en L. Mosekilde, „Diurnal rhythm of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein in postmenopausal women: relationship to plasma parathyroid hormone and calcium and phosphate metabolism.,” *Eur J Endocrinol*, nr. 146-5, pp. 635-642, 2002.
- [11] P. White en N. Cooke, „The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein,” *Trends Endocrinol Metab*, vol. 11, nr. 8, pp. 320-327, 2000.

- [12] M. E. Harper en A. Dugaiczky, „Linkage of the Evolutionarily-related Serum Albumin and Alpha-fetoprotein Genes within Q11-22 of Human Chromosome 4.,” *American Journal of Human Genetics*, nr. 35-4, pp. 565-572, 1983.
- [13] L. R. Weitkamp en P. Z. Allen, „Evolutionary Conservation of Equine Gc Alleles and of Mammalian Gc/albumin Linkage,” *Genetics*, nr. 92.4, pp. 1347-1354, 1979.
- [14] C. Verboven, A. Rabijns, M. De Maeyer, H. Van Baelen, R. Bouillon en C. De Ranter, „A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein.,” *Nat Struct Biol*, vol. 9, nr. 2, pp. 131-136, 2002.
- [15] N. Yamamoto en V. R. Naraparaju, „Vitamin D3-Binding Protein as a Precursor for Macrophage Activating Factor in the Inflammation-Primed Macrophage Activation Cascade in Rats,” *Cellular Immunology*, nr. 170-2, pp. 161-167, 1996.
- [16] A. Braun, R. Bichlmaier en H. Cleve, „Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): Allelic differences of the common genetic GC types.,” *Human Genetics*, nr. 89-4, pp. 401-406, 1992.
- [17] M. Kawakami, C. B. Blum, R. Ramakrishnan, R. B. Dell en D. S. Goodman, „Turnover of the plasma-binding protein for vitamin-D and its metabolites in normal human-subjects,” *J Clin Endocrinol Metab*, nr. 53-6, pp. 1110-1116, 1981.
- [18] L. Rejnmark, A. L. Lauridsen, P. Vestergaard, L. Heickendorff en F. Andreasen, „Diurnal rhythm of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein in postmenopausal women: relationship to plasma parathyroid hormone and calcium and phosphate metabolism.,” *Eur J Endocrinol*, nr. 146-5, pp. 635-642, 2002.
- [19] J. Zempleni, R. B. Rucker, W. J. Suttie en D. B. McCormick, *Handbook of Vitamins*, Taylor & Francis, 2007.
- [20] L. A. Plum en H. F. DeLuca, „The Functional Metabolism and Molecular Biology of Vitamin D Action,” *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, nr. 7-1, pp. 20-41, 2009.
- [21] M. Audran en R. Kumar, „The Physiology and Pathophysiology of Vitamin D,” *Mayo Clinic Proceedings*, nr. 60-12, pp. 851-866, 1985.
- [22] B. Lehmann en M. Meurer, „Vitamin D metabolism,” *Dermatologic Therapy*, nr. 23-1, pp. 2-12, 2010.
- [23] C. Mathieu en K. Badenhop, „Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art,” *Trends in Endocrinology & Metabolism*, nr. 16-6, pp. 261-266, 2005.
- [24] R. Kumar, „The metabolism and mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D3,” *Kidney International*, nr. 30-6, pp. 793-803, 1986.

- [25] S. P. Daiger, L. L. Cavalli-Sforza en M. S. Schanfield, „Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, nr. 72, pp. 2076-2080, 1975.
- [26] N. E. Cooke en J. G. Haddad, „Vitamin D Binding Protein (Gc-Globulin),” *Endocrine Reviews*, nr. 10-3, pp. 294-307, 1989.
- [27] C. Mendel, „The Free Hormone Hypothesis: A Physiologically Based Mathematical Model,” *Endocrine Reviews*, nr. 10-3, pp. 232-274, 1989.
- [28] R. Bouillon, H. Van Baelen, W. Heyns, P. De Moor en F. A. Van Assche, „Influence of the vitamin D binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3,” *Journal of Clinical Investigation*, nr. 67-3, pp. 589-596, 1961.
- [29] H. J. van Hoof, R. G. de Sevaux, H. van Baelen, L. M. Swinkels, C. Klipping, H. A. Ross en C. Sweep, „Relationship between free and total 1,25-dihydroxyvitamin D in conditions of modified binding,” *European Journal of Endocrinology*, nr. 144-4, pp. 391-396, 2001.
- [30] W. M. Lee en R. M. Galbraith, „The Extracellular Actin-Scavenger System and Actin Toxicity,” *New England Journal Of Medicine*, nr. 326-20, pp. 1335-1341, 1992.
- [31] N. Swamy en R. Ray, „Fatty acid-binding site environments of serum vitamin D-binding protein and albumin are different,” *Bioorganic Chemistry*, nr. 36-3, pp. 165-168, 2008.
- [32] J. M. Ena, C. Esteban, M. D. Perez, J. Uriel en M. Calvo, „Fatty acids bound to vitamin D-binding protein (DBP) from human and bovine sera,” *Biochemistry International*, nr. 19-1, pp. 1-7, 1989.
- [33] M. Calvo en J. M. Ena, „Relations between vitamin D and fatty acid binding properties of vitamin D-binding protein,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, nr. 163-1, pp. 14-17, 1989.
- [34] R. R. Kew, J. J. Fischer en R. O. Webster, „Co-chemotactic effect of Gc-globulin (vitamin D binding protein) for C5a,” *Journal of Immunology*, nr. 155-11, pp. 5369-5374, 1995.
- [35] R. Binder, A. Kress, G. Kan, K. Herrmann en M. Kirschfink, „Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (Gc-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst,” *Molecular Immunology*, nr. 36-13,14, pp. 885-892, 1999.
- [36] L. A. McVoy en R. R. Kew, „CD44 and Annexin A2 Mediate the C5a Chemotactic Cofactor Function of the Vitamin D Binding Protein,” *Journal of Immunology*, nr. 175-7, pp. 4754-4760, 2005.
- [37] K. Nonaka, S. Onizuka, H. Ishibashi, Y. Uto, H. Hori, T. Nakayama, N. Matsuura, T. Kanematsu en H. Fujioka, „Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor Inhibits HCC in SCID Mice,” *Journal Of Surgical Research*, nr. 172-1, pp. 116-122, 2012.

- [38] B. Allard, M. Turcotte, K. Spring, S. Pommey, I. Royal en J. Stagg, „Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis,” *International Journal of Cancer*, nr. 134-6, pp. 1466-1473, 2013.
- [39] S. Kanda, Y. Mochizuki, Y. Miyata, H. Kanetake en N. Yamamoto, „Effects of Vitamin D3-Binding Protein-Derived Macrophage Activating Factor (GcMAF) on Angiogenesis,” *Journal of the National Cancer Institute*, nr. 94-17, pp. 1311-1319, 2002.
- [40] S. Kalkunte, L. Brard, C. O. Granai en N. Swamy, „Inhibition of angiogenesis by vitamin D-binding protein: Characterization of anti-endothelial activity of DBP-maf,” *Angiogenesis*, nr. 8-4, pp. 349-360, 2006.
- [41] O. A. Adebajo, B. S. Moonga, J. G. Haddad, C. L. Huang en M. Zaidi, „A Possible New Role for Vitamin D-Binding Protein in Osteoclast Control: Inhibition of Extracellular Ca<sup>2+</sup>Sensing at Low Physiological Concentrations,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, nr. 249-3, pp. 668-671, 1998.
- [42] N. Swamy, S. Ghosh, G. B. Schneider en R. Ray, „Baculovirus-expressed vitamin D-binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) activates osteoclasts and binding of 25-hydroxyvitamin D3 does not influence this activity,” *Journal of Cellular Biochemistry*, nr. 81, pp. 535-546, 2001.
- [43] P. T. Gomme en J. Bertolini, „Therapeutic potential of vitamin D-binding protein,” *Trends in Biotechnology*, nr. 22-7, pp. 340-345, 2004.
- [44] A. M. Wang, D. F. Bishop en R. J. Desnick, „Human alpha-N-acetylgalactosaminidase-molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA. Homology with human alpha-galactosidase A suggests evolution from a common ancestral gene,” *Journal of Biological Chemistry*, nr. 265-35, pp. 21859-66, 1990.
- [45] N. E. Clark en S. C. Garman, „The 1.9 Å Structure of Human α-N-Acetylgalactosaminidase,” *J. Mol. Biol.*, nr. 393, pp. 435-447, 2009.
- [46] S. B. Mohamad, H. Nagasawa, Y. Uto en H. Hori, „Tumor cell alpha-N-acetylgalactosaminidase activity and its involvement in GcMAF-related macrophage activation,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, nr. 134-2, p. 481, 2003.
- [47] M. Greco, M. De Mitri, F. Chiriaco, G. Leo, E. Brianza en M. Maffia, „Serum proteomic profile of cutaneous malignant melanoma and relation to cancer progression: Association to tumor derived alpha-N-acetylgalactosaminidase activity,” *Cancer Letters*, nr. 283-2, pp. 222-229, 2009.
- [48] G. Suresh Babu, A. Naga Supriya, N. Govind Raj Kumar en P. Swetha, „Tumor markers: An overview,” *Journal of Orofacial Sciences*, nr. 4-2, pp. 87-95, 2012.

- [49] M. Nagpal, S. Singh, P. Singh, P. Chauhan en M. A. Zaidi, „Tumor markers: A diagnostic tool,” *National Journal of Maxillofacial Surgery*, nr. 7-1, pp. 17-20, 2016.
- [50] L. Bingling, D. Yan, L. Toa en D. Shaojun, „Investigation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNAzyme,” *Analytica Chimica Acta*, nr. 651-2, pp. 234-340, 2009.
- [51] S. Frasca , „Biocatalysis on nanostructured surfaces: investigation and application of redox proteins using spectro-electrochemical methods,” 2012.
- [52] M. Greiner, D. Pfeiffer en R. D. Smith, „Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests.,” *Preventive Veterinary Medicine*, nr. 45-1-2, pp. 23-41, 2000.
- [53] M. Kudelka, T. Ju, J. Heimbürg-Molinario en R. Cummings, „Simple Sugars to Complex Disease—Mucin-Type O-Glycans in Cancer,” *Advanced Cancer Research*, nr. 126, pp. 53-135, 2015.
- [54] G. Makowsky, *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier Science Publishing, 2014.
- [55] J. W. Pike, F. H. Glorieux en D. Feldman, *Vitamin D*, Vol 1-2, San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [56] R. F. Chun, „New perspectives on the vitamin D binding protein,” *Cell Biochemistry and function*, nr. 30-6, pp. 445-456, 2012.
- [57] M. Speeckaert, G. Huang, J. R. Delanghe en Y. E. Taes, „Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism,” *Clinica Chimica Acta*, nr. 372-1,2, pp. 33-42, 2006.





## Bijlagen

Bijlage 1: Protocol voor de sandwich ELISA van het complex  
Reagentia

### A. Nagalase coating

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

- 100 µg oplossen in 1 ml PBS (fosfaatgebufferde zoutopl) → 100 µg/ml (stockoplossing)
- Stockoplossing aliquoteren in 100 µl (100 µg/ml) (bewaren in diepvries)
- Coatingconcentratie = 0,1 µg/mL → 1000x verdunnen in coatingsbuffer
  - volume = 150 µl/well → 150 x 100 wells = 1500 µl = 15 ml voor volledige plaat
  - 15 µl stockoplossing verdunnen met 14 985 µl coatingsbuffer

- *Coatingsbuffer: bicarbonaatbuffer 100 mM pH = 9,6*

- Voor 1 l: 8,18 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·10H<sub>2</sub>O  
6,0 g NaHCO<sub>3</sub>
- Voor 100 ml: 0,818 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·10H<sub>2</sub>O  
0,60 g NaHCO<sub>3</sub>

- *Blocking oplossing: 5% Tween 20 (polysorbaat) in PBS*

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

- *Wasbuffer: 0,05 % Tween 20 in PBS*

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

- *Substraatbuffer: fosfaat/citraatbuffer pH = 4,7*

- Voor 100 ml: 3,263 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
1,921 g citroenzuur (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)
- Voor 50 ml: 1,632 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
0,961 g citroenzuur (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)

- *Substraat: 4-Methylumbelliferyl-alpha-N-acetyl-D-galactosaminide (MUNAGA)*

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

## B. DBP

- *coating buffer* (1l)

- 8,18 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
- 6 g  $\text{NaHCO}_3$

- *washsolution* (2l)

- 16,013 g  $\text{NaCl}$
- 4,026 g  $\text{KCl}$
- 2,643 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,408 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1 ml TWEEN-20®

- *reagent diluent* → blocking oplossing

- 10 ml TWEEN-20®
- 190 ml PBS

- *substraatoplossing*

- TMB Microwell Peroxidase Substrate System 1:1

- *stopsolution*

- 0,2 M HCL

- *serum diluent* (1l)

- 70 g solugel
- 3 g natriumcitraatdihydraat
- 7 g  $\text{NaCl}$

- *serumstalen*

- secundair As: polyclonal Rabbit Anti-Human Gc-globuline HRP conjugate

## Methode

### Coaten plaat:

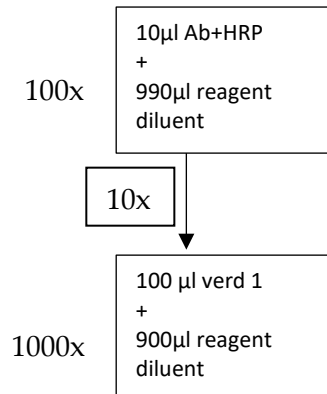
1. pipetteer in elke well 150  $\mu$ l *capture* AB
2. incubeer overnacht bij 25°C op een schudder
3. Recycleer de overige Ab's voor een volgende plaat
  - a. giet samen met de resterende Ab's in de frigo
  - b. meng mbv pipet
  - c. breng over op volgende plaat
  - d. incubeer overnacht op 25°C
4. 3x plaat wassen met wash solution
5. Plaat droog kloppen
6. pipetteer in elke well 300  $\mu$ l *blocking* oplossing
7. incubeer 1u bij 25°C (ZONDER schudden)
8. was plaat 3x
9. klop plaat droog.

### Meting:

1. Indien de welletjes uit de frigo komen → wassen met wash solution en drogen
2. pipetteer in elke well 125  $\mu$ l staal (onverdund) en in 1 well serum pool
3. incubeer 2u op 37°C (MET schudden)
4. was plaat 3x
5. klop plaat droog
6. Stel temperatuur Victor in op 25°C

## DBP metingen

1. verdun het secundair As met reagent diluent 1000x



2. was de plaat 3 keer met de wash solution + droog
3. pipetteer 175 µL van het verdund gelabeld Ab-HRP in elk welletje
4. incubeer 2 uur op kamertemperatuur in Victor: stel in op 300 sec voor 6 metingen (schudden)
5. was de plaat 3 keer met de wash solution + droog
6. maak het 1:1 substraat door van elk deel gelijke hoeveelheden toevoegen (150 µl per staal)
7. pipeteer 150 µL substraat (1:1 substraat) in elk welletje
8. incubeer 15 min op kamertemperatuur in het donker
9. Voeg 150 µL stopsolution (HCl) toe in elk welletje
10. Meet absorbantie bij 450 nm met behulp van de Victor X4 Multilabel Plate Reader

## Bijlage 2: Protocol nagalase metingen met *fluorescence assay* (dissociatie complex)

### Reagentia

#### - Natriumcitraatbuffer pH 5,8 maken

- Citroenzuur aanpassen tot pH 5,8 met 5M NaOH
- pH corrigeren met NaOH of HCl

#### - 75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> met natriumcitraatbuffer

- 37,5 ml 100% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 12,5 ml natriumcitraat

#### - Bicarbonaat (pH 10)

- Voor 50 ml: 0.52 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·10H<sub>2</sub>O  
0.32 g NaHCO<sub>3</sub>

Opgelost in H<sub>2</sub>O

- pH aanpassen tot pH 10 met NaOH of HCl

#### - Substraat (MUNAGA)

- Stockoplossing: 0,5 mg/ml → 60x verdunnen in PBS  
→ 50 µl per staal

### Methode

#### 1. Stalen maken:

- Stalen 10x verdunnen met 75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (totale nagalase = oorspronkelijke nagalase + gedissocieerd van complex)  
→ 100 µl staal + 900 µl 75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/PBS
- Stalen 10x verdunnen met PBS (oorspronkelijke nagalase)  
→ 100 µl staal + 900 µl 75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/PBS
- Standaardreeks: serum pool serieel verdunnen in PBS (1x – 2x – 4x – 8x – 16x – 32x – 64x)

#### 2. Half uur incuberen op kamertemperatuur

##### Enkel stalen met ammoniumsulfaat:

- Centrifugeren (3500xg, 1h)
- Supernatant weg gieten, pellet oplossen in natriumcitraatbuffer (200 µl) mbv vortex

#### 3. Stalen: 25 µl PBS in welletjes van plaat + 25 µl verdund staal (met PBS en ammoniumsulfaat)

#### 4. Standaarden (dubbel inzetten): 50 µl in welletjes

#### 5. In Victor multiplate reader: MU acid kinetics

- Pompen vullen: Pomp 1: bicarbonaatoplossing  
Pomp 2: MUNAGA oplossing

Bijlage 3: Data van de normale controles

Staalnummer	fnaga (nmol/min.ml)	tnaga (nmol/min.ml)	dnaga (nmol/min.ml)	Complex (absorbantie)
1	0,363	0,947	0,584	0,478
2	0,955	1,318	0,363	0,449
3	0,676	0,674	-0,002	0,336
4	0,736	1,731	0,994	0,352
5	0,863	1,801	0,938	0,457
6	0,685	1,534	0,849	0,438
7	0,698	1,277	0,579	0,442
8	0,766	1,444	0,678	0,473
9	0,714	0,838	0,124	0,351
10	0,672	1,827	1,155	0,393
11	0,859	1,338	0,479	0,305
12	0,564	1,027	0,464	0,288
13	0,806	2,140	1,333	0,367
14	0,536	1,815	1,279	0,505
15	0,491	1,658	1,168	0,399
16	0,494	1,690	1,196	0,472
17	0,427	1,399	0,972	0,346
18	0,358	1,165	0,806	0,442
19	0,846	1,899	1,053	0,486
20	0,500	1,374	0,874	0,524
21	0,410	1,904	1,494	0,337
22	0,537	2,342	1,804	0,405
23	0,195	1,580	1,385	0,330
24	0,305	1,896	1,591	0,464
25	0,618	2,387	1,769	0,333
26	0,372	1,594	1,222	0,369
27	0,388	1,902	1,514	0,341
28	0,340	1,606	1,265	0,556
29	0,668	2,375	1,707	0,263
30	0,164	0,773	0,609	0,287
31	0,225	0,862	0,637	0,299
32	0,443	1,575	1,132	0,428
33	0,300	1,090	0,789	0,428
34	0,452	1,598	1,146	0,312
35	0,187	0,843	0,656	0,494
36	0,368	1,443	1,076	0,461
37	0,488	1,759	1,271	0,355

fnaga: vrije nagalaseactiviteit

tnaga: totale nagalaseactiviteit

dnaga: verschil in nagalaseactiviteit

complex: metingen complexactiviteiten

Bijlage 4: Data van de verhoogde CA125 stalen

Staalnummer	fnaga (nmol/min.ml)	tnaga (nmol/min.ml)	dnaga (nmol/min.ml)	Complex (absorbantie)
1	0,497	2,226	1,729	0,364
2	0,709	2,255	1,547	0,344
3	0,694	2,266	1,573	0,285
4	0,358	1,814	1,456	0,335
5	0,908	2,754	1,846	0,653
6	0,639	2,440	1,801	0,950
7	0,044	0,897	0,853	0,282
8	0,495	1,941	1,446	0,224
9	0,526	2,808	2,281	0,245
10	0,270	1,639	1,368	0,221
11	0,096	1,111	1,014	0,292
12	0,218	1,551	1,333	0,302
13	0,115	1,326	1,211	0,331
14	0,334	1,559	1,225	0,320
15	0,272	1,517	1,244	0,180
16	0,479	2,353	1,874	0,282
17	0,200	1,170	0,969	0,262
18	0,331	1,525	1,194	0,371
19	0,964	2,115	1,150	0,357
20	0,664	2,020	1,356	0,234
21	1,854	3,743	1,889	0,666
22	1,439	3,300	1,862	0,381
23	1,195	2,437	1,242	0,405
24	0,921	1,981	1,060	0,274
25	1,777	3,084	1,308	0,354
26	0,980	8,643	7,664	0,252
27	1,549	4,922	3,373	0,367
28	1,080	4,052	2,972	0,326
29	0,714	2,792	2,078	0,189
30	0,786	2,675	1,889	0,338
31	1,477	5,157	3,680	0,195
32	0,957	2,825	1,867	0,427
33	1,015	3,132	2,117	0,121
34	1,164	3,067	1,903	0,292

fnaga: vrije nagalaseactiviteit

tnaga: totale nagalaseactiviteit

dnaga: verschil in nagalaseactiviteit

complex: metingen complexactiviteiten



Bijlage 5: Data van verhoogde CA153 stalen

Staalnummer	fnaga (nmol/min.ml)	tnaga (nmol/min.ml)	tnaga (nmol/min.ml)	Complex (absorbantie)
1	0,275	1,465	1,190	0,362
2	0,338	1,784	1,445	0,405
3	0,394	1,851	1,457	0,281
4	0,269	1,515	1,245	0,453
5	0,312	1,609	1,297	0,474
6	0,000	2,148	/	0,493
7	2,909	0,000	/	0,571
8	0,325	1,609	1,284	0,494
9	0,057	0,593	0,535	/
10	0,108	0,659	0,551	0,351
11	0,668	2,144	1,475	0,201
12	0,405	1,821	1,415	0,348
13	0,740	2,322	1,582	0,289
14	0,294	1,486	1,192	/
15	0,635	1,973	1,339	0,286
16	0,376	1,320	0,944	/
17	0,470	1,681	1,211	0,216
18	1,685	4,258	2,573	0,852
19	2,042	3,835	1,794	0,455
20	0,946	3,038	2,092	0,223
21	0,919	3,025	2,106	0,406
22	0,810	2,806	1,996	0,219
23	0,817	2,598	1,782	0,273
24	0,766	2,619	1,853	0,470
25	0,832	2,034	1,202	0,332
26	0,811	2,471	1,660	0,784
27	1,134	3,096	1,963	0,267
28	0,873	2,694	1,821	0,215
29	1,782	4,081	2,299	0,226
30	1,804	3,526	1,722	0,219
31	0,904	2,649	1,745	0,243
32	0,750	2,362	1,612	0,209
33	1,075	2,823	1,748	0,509

fnaga: vrije nagalaseactiviteit

tnaga: totale nagalaseactiviteit

dnaga: verschil in nagalaseactiviteit

complex: metingen complexactiviteiten

Bijlage 6: Data van verhoogde CA199 stalen

Staalnummer	fnaga (nmol/min.ml)	tnaga (nmol/min.ml)	tnaga (nmol/min.ml)	Complex (absorbantie)
1	0,407	1,404	0,997	0,258
2	0,173	1,071	0,898	0,252
3	0,189	0,884	0,695	0,333
4	0,087	1,246	1,159	0,261
5	0,515	1,484	0,970	0,279
6	0,129	1,052	0,923	0,191
7	0,292	1,506	1,214	0,209
8	0,157	0,984	0,827	0,186
9	0,304	1,756	1,451	/
10	0,558	3,096	2,538	0,518
11	0,510	1,670	1,160	0,212
12	0,332	1,366	1,034	0,303
13	0,195	1,193	0,998	/
14	0,330	1,254	0,924	0,295
15	0,614	2,052	1,438	/
16	0,386	1,680	1,295	0,294
17	0,392	1,662	1,270	0,262
18	0,284	1,272	0,988	/
19	1,102	3,127	2,026	0,176
20	0,868	2,289	1,420	0,626
21	2,468	3,203	0,735	0,223
22	1,027	2,809	1,781	0,325
23	0,283	1,536	1,253	0,303
24	1,309	3,639	2,329	0,255
25	0,794	2,605	1,811	0,187
26	0,988	2,941	1,953	0,289
27	1,194	3,406	2,213	0,463
28	0,804	1,991	1,187	0,293
29	0,703	2,470	1,767	0,427
30	1,292	3,943	2,651	0,360
31	0,713	2,475	1,762	0,075
32	0,420	1,719	1,299	0,420
33	0,825	2,576	1,751	0,456

fnaga: vrije nagalaseactiviteit

tnaga: totale nagalaseactiviteit

dnaga: verschil in nagalaseactiviteit

complex: metingen complexactiviteiten

Bijlage 7: Data van verhoogde PSA stalen

Staalnummer	fnaga (nmol/min.ml)	tnaga (nmol/min.ml)	dnaga (nmol/min.ml)	Complex (absorbantie)
1	0,331	1,870	1,539	0,273
2	0,653	2,550	1,898	0,361
3	0,897	3,516	2,619	0,354
4	0,595	2,524	1,929	0,368
5	0,751	2,436	1,685	0,399
6	0,627	2,135	1,508	0,286
7	0,657	2,417	1,760	0,274
8	3,399	2,031	-1,367	0,351
9	1,376	1,569	0,192	0,359
10	1,008	1,488	0,480	0,402
11	0,593	1,073	0,481	0,455
12	1,421	3,639	2,218	0,162
13	0,562	1,309	0,746	0,356
14	0,329	0,481	0,152	0,320
15	0,531	1,279	0,748	0,288
16	0,857	1,610	0,753	0,308
17	0,561	1,568	1,007	0,311
18	0,722	2,017	1,295	0,346
19	0,309	1,222	0,914	0,321
20	1,011	1,328	0,317	0,272
21	0,826	2,405	1,579	0,429
22	1,146	2,681	1,535	0,284
23	0,275	0,964	0,690	0,310
24	0,454	1,575	1,121	0,260
25	0,627	1,741	1,113	0,297
26	0,895	2,901	2,006	0,344
27	0,575	1,336	0,761	0,392
28	1,172	3,253	2,081	0,310
29	0,367	1,088	0,721	0,357
30	0,325	1,026	0,701	0,248
31	0,623	2,072	1,448	0,289
32	0,892	2,450	1,558	0,292
33	0,331	1,870	1,539	0,273
34	0,653	2,550	1,898	0,361

fnaga: vrije nagalaseactiviteit

tnaga: totale nagalaseactiviteit

dnaga: verschil in nagalaseactiviteit

complex: metingen complexactiviteiten

Bijlage 8: Data van verhoogde CEA stalen

Staalnummer	fnaga (nmol/min.ml)	tnaga (nmol/min.ml)	dnaga (nmol/min.ml)	Complex (absorbantie)
1	0,430	1,790	1,360	1,091
2	0,460	1,430	0,970	1,280
3	0,560	2,020	1,460	0,723
4	0,790	3,120	2,330	0,766
5	0,770	2,800	2,030	1,173
6	1,080	4,370	3,290	1,340
7	0,580	2,090	1,510	0,696
8	0,640	2,370	1,730	1,103
9	1,070	5,140	4,070	0,669
10	0,630	2,390	1,760	0,796
11	1,040	4,360	3,320	0,825
12	0,480	1,920	1,440	0,836
13	0,670	2,560	1,890	0,474
14	0,413	1,584	1,171	0,846
15	0,499	2,057	1,558	0,665
16	0,000	1,912	1,912	0,657
17	0,404	1,315	0,911	0,833
18	0,665	1,518	0,853	0,687
19	0,815	1,869	1,055	0,588
20	0,830	2,047	1,217	0,846
21	0,428	1,664	1,237	1,017
22	0,755	2,057	1,302	0,760
23	0,628	2,294	1,667	0,780
24	0,705	1,476	0,772	0,904
25	1,658	1,720	0,062	0,742
26	0,970	1,165	0,196	0,771
27	0,603	1,468	0,865	/
28	0,553	1,687	1,135	0,406
29	0,261	0,956	0,695	0,281
30	0,535	1,124	0,589	0,275
31	0,340	1,516	1,176	0,171
32	0,728	2,650	1,922	0,157

fnaga: vrije nagalaseactiviteit

tnaga: totale nagalaseactiviteit

dnaga: verschil in nagalaseactiviteit

complex: metingen complexactiviteiten

## Bijlage 9: Data van patiënt met darmkanker in functie van de tijd

Dagen	fnaga	tnaga	dnaga	Complex (abs)	CEA (µg/l)	CA199 (kU/l)	WB	CRP	Ratio complex
303	0,76	1,59	0,83	1,76	176,2	7509	10740	54,7	4,40
284	0,90	1,68	0,78	0,52	100,5	2745	15650	181,5	1,30
276	1,20	2,69	1,50	0,27	142	5969	12440	65,4	0,68
262	1,30	2,76	1,46	0,30	253,3	11696	7350	17,3	0,76
259	3,34	6,51	3,18	0,22	211,8	11654	4400	10,3	0,55
254	1,02	2,24	1,22	0,15	176,5	6252	2370	30,4	0,38
241	1,23	2,64	1,41	0,15	285,4	11160	3170	9,4	0,38
211	1,08	2,21	1,13	0,08	32,2	2246	6910	16,1	0,20
176	1,32	3,09	1,77	0,07	99,7	3896	6640	11,3	0,18
157	0,74	1,76	1,02	0,22	96,2	5373	2560	13,5	0,56
143	0,60	1,21	0,62	0,19	102,3	4852	2930	8,7	0,47
123	0,78	1,99	1,20	0,37	181,5	8776	4520	16,4	0,92
105	0,66	1,79	1,13	0,39	301	12000	6960	58,7	0,98
87	0,75	1,58	0,82	0,22	115,6	6083	5280	19,4	0,56
46	0,75	1,58	0,83	0,25	47,5	3076	5250	4,2	0,62
29	0,82	2,01	1,19	0,24	43,2	3258	5680	5,9	0,60
0	3,03	2,61	-0,41	0,50	61	4728	5130	6,2	1,26

fnaga: vrije nagalaseactiviteit in (nmol/min.ml)

tnaga: totale nagalaseactiviteit in (nmol/min.ml)

dnaga: verschil in nagalaseactiviteit in (nmol/min.ml)

complex: metingen complexactiviteiten

WB: witte bloedcellen in (aantal/µl)

CRP: C-reactive protein in (mg/l)