

# Kankerscreening met behulp van nagalase en nagalase-DBP-MAF-complex

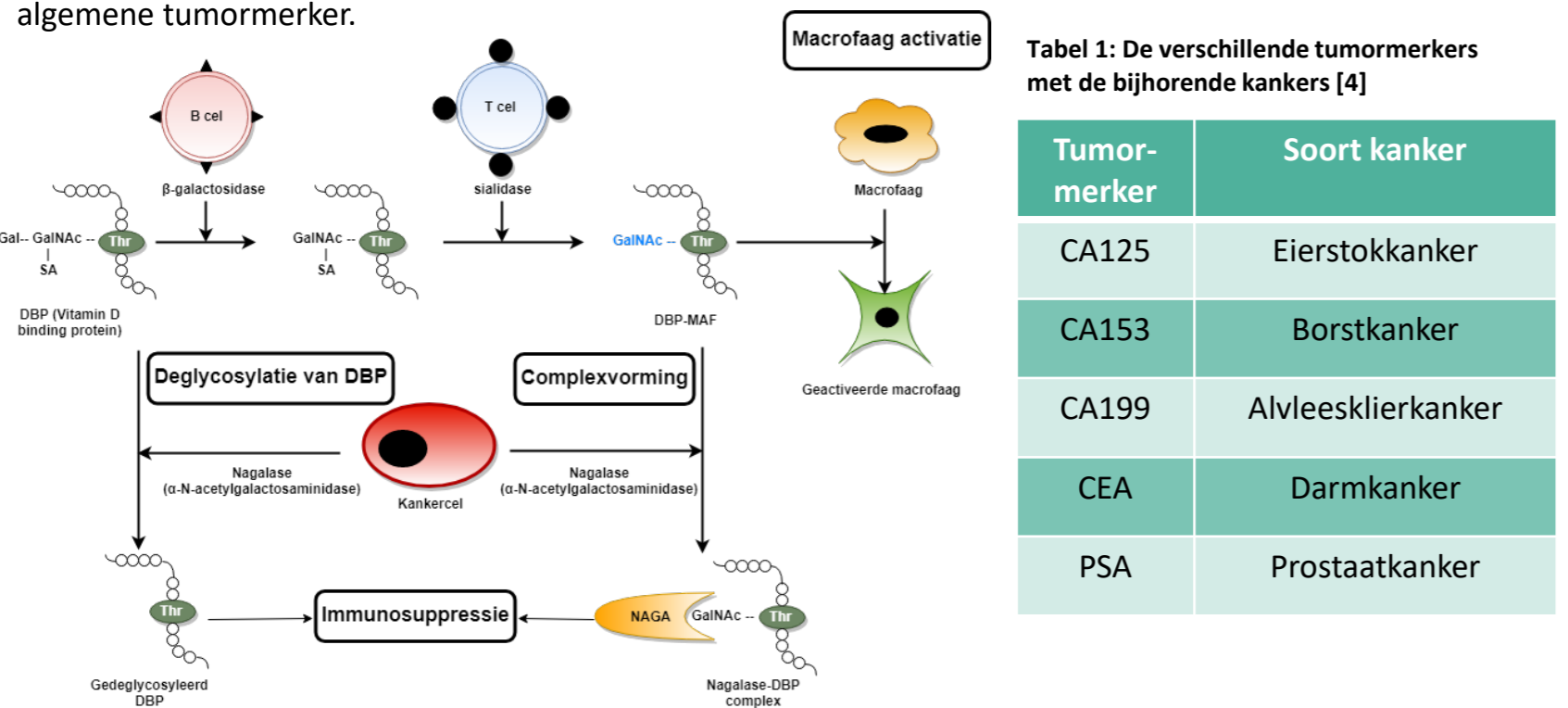
Laurens Ignoul

Master IW biochemie

## Achtergrond

Het vitamine-D-bindend proteïne (DBP) heeft naast het transport van vitamine D ook een immunologische functie. Het kan omgezet worden naar een macrofaagactiverende factor (DBP-MAF) [1]. Deze precursoractiviteit van DBP wordt tenietgedaan door de activiteit van het enzym nagalase, welke tot overexpressie gebracht wordt door tumorcellen in kankerpatiënten [2]. Dit enzym kan ook een inactief complex vormen met DBP-MAF. Deze twee mechanismen van nagalase dragen bij tot immunosuppressie door tumorcellen [3].

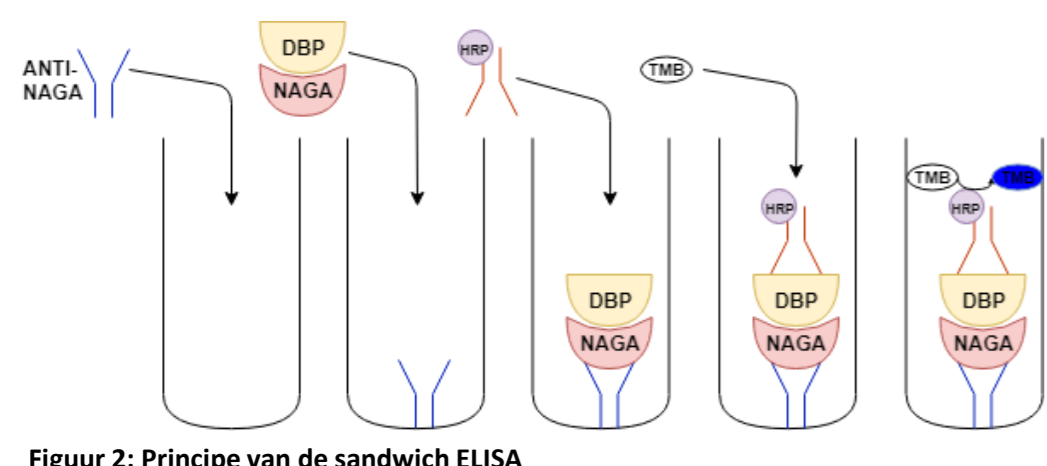
Er bestaan verschillende tumormerkers om verschillende tumoren en kankers aan te tonen. Er is echter nog geen algemene tumormerker in het bloed die kan aantonen of er al dan niet een tumor aanwezig is [4]. Daarom wordt in deze masterproef onderzocht of de hoeveelheid complexvorming, de vrije nagalaseactiviteit, de totale nagalaseactiviteit of het verschil in nagalaseactiviteit gebruikt kunnen worden als mogelijke algemene tumormerker.



Figuur 1: Mechanisme hoe DBP wordt omgezet naar DBP-MAF, gedeglycosyleerd naar een inactief DBP of gecomplexeerd tot het nagalase-DBP-MAF-complex [1]

## Materiaal en methode

### Complex Sandwich ELISA



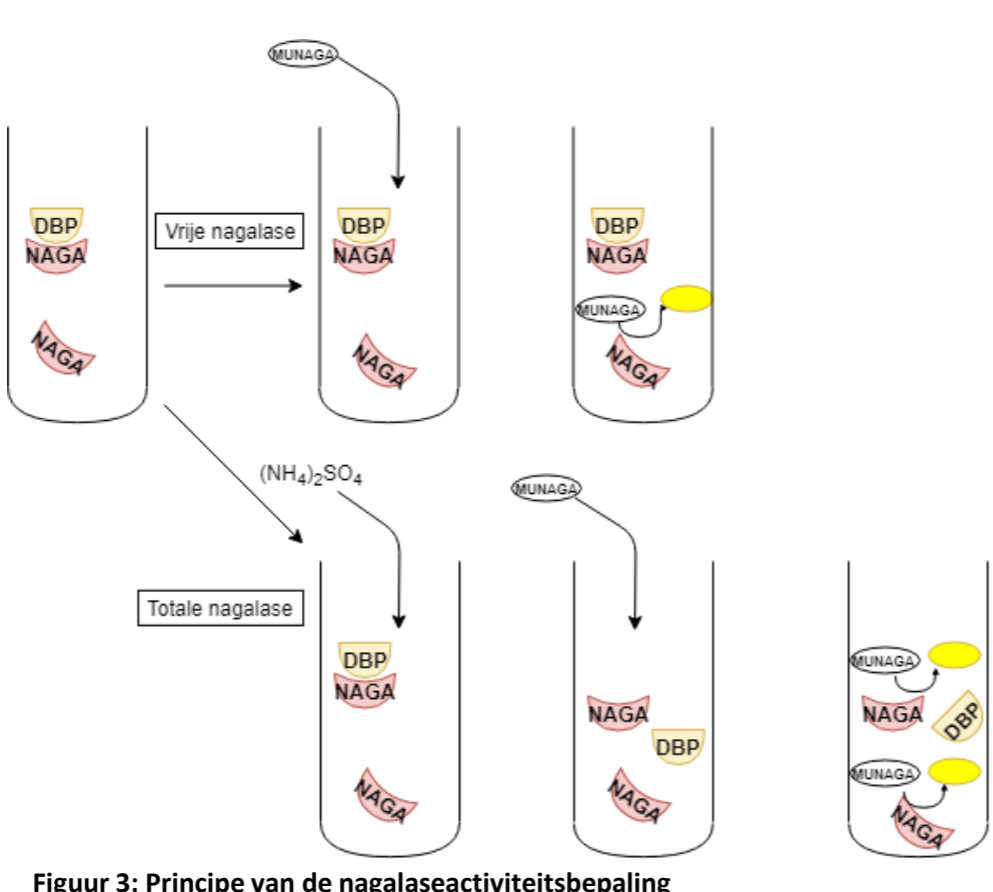
Figuur 2: Principe van de sandwich ELISA

Met een sandwich ELISA kan het complex aangetoond en gekwantificeerd worden. Nagalase wordt gevangen door het capture antilichaam en vervolgens wordt het detectieantilichaam toegevoegd wat bindt aan DBP-MAF. Aan het detectieantilichaam is een enzym (HRP) geconjugeerd wat het substraat TMB zal omzetten naar een blauw gekleurd product. Dit signaal wordt vervolgens gemeten.

### Nagalase Fluorescence Assay

Om de activiteit van nagalase in het bloed te bepalen wordt een *fluorescence assay* gebruikt. De vrije nagalaseactiviteit (fnaga) wordt gemeten door het substraat (MUNAGA) toe te voegen dat door nagalase omgezet wordt naar een fluorescent product. Het nagalase dat gecomplexeerd is met DBP-MAF zal geen activiteit vertonen.

Door het toevoegen van ammoniumsulfaat zal het nagalase-DBP-MAF-complex dissociëren in nagalase en DBP-MAF. Wanneer het substraat toegevoegd wordt, zal het vrije nagalase en het eerder gecomplexeerd nagalase activiteit vertonen. Deze 2 samen zijn de totale nagalaseactiviteit (tnaga). Het verschil tussen de totale en de vrije nagalaseactiviteit geeft de activiteit van gecomplexeerde nagalase (dnaga).

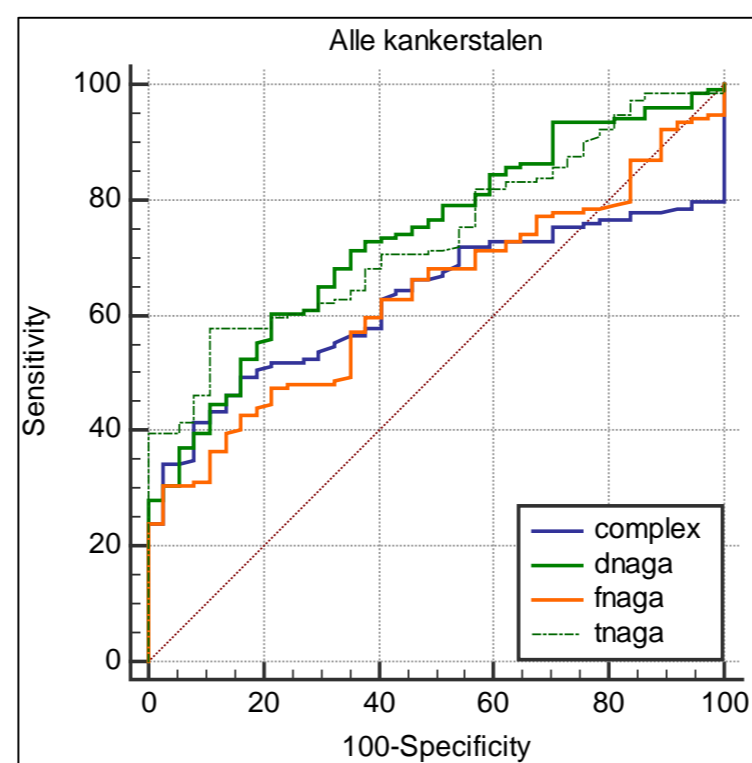


Figuur 3: Principe van de nagalaseactiviteitsbepaling

## Resultaten

### ROC-curves

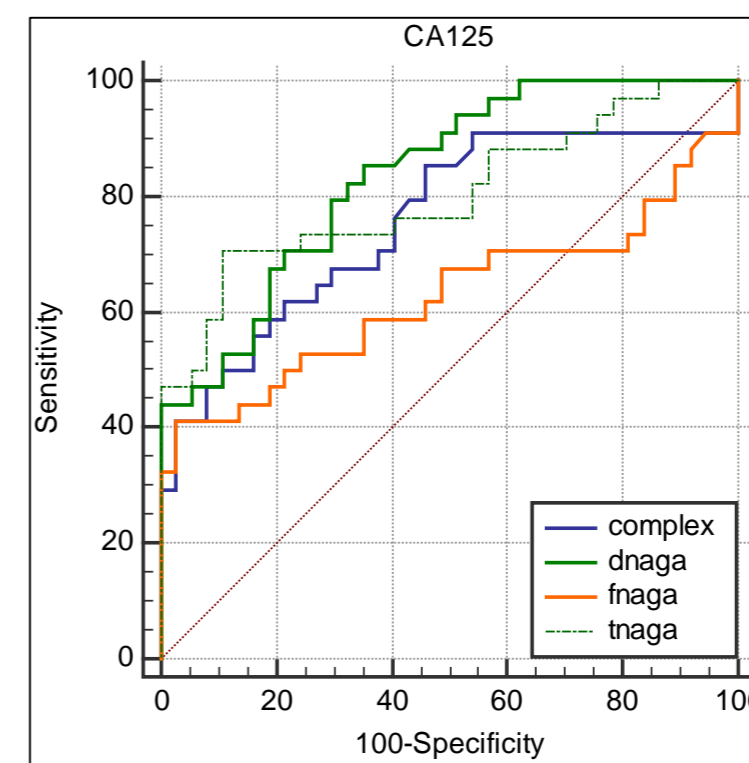
In de onderstaande ROC-curves wordt weergegeven welke van de metingen het beste een onderscheid maakt tussen normale controles (gezond) en kankerstalen. De Area Under the Curve (AUC) moet groter zijn dan 0,500 om de twee groepen significant te kunnen onderscheiden. Dit is significant indien de P-waarde kleiner is dan 0,05 [5]. In totaal werden er 193 stalen gemeten waarvan 37 normale controles en 156 kankerstalen.



Figuur 4: ROC-curve van alle gemeten stalen

**Tabel 2: AUC en P-waarde per meting van alle gemeten stalen**

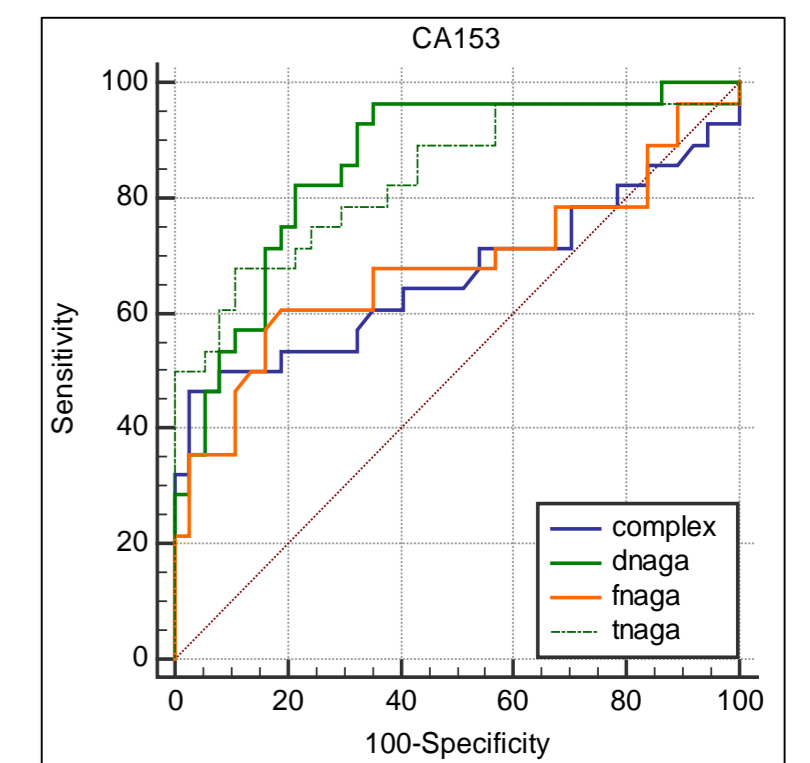
Meting	AUC	P
Complex	0,620	0,003
fnaga	0,613	0,009
tnaga	0,716	<0,001
dnaga	0,726	<0,001



Figuur 5: ROC-curve van de verhoogde CA125 stalen

**Tabel 3: AUC en P-waarde per meting van CA125 stalen**

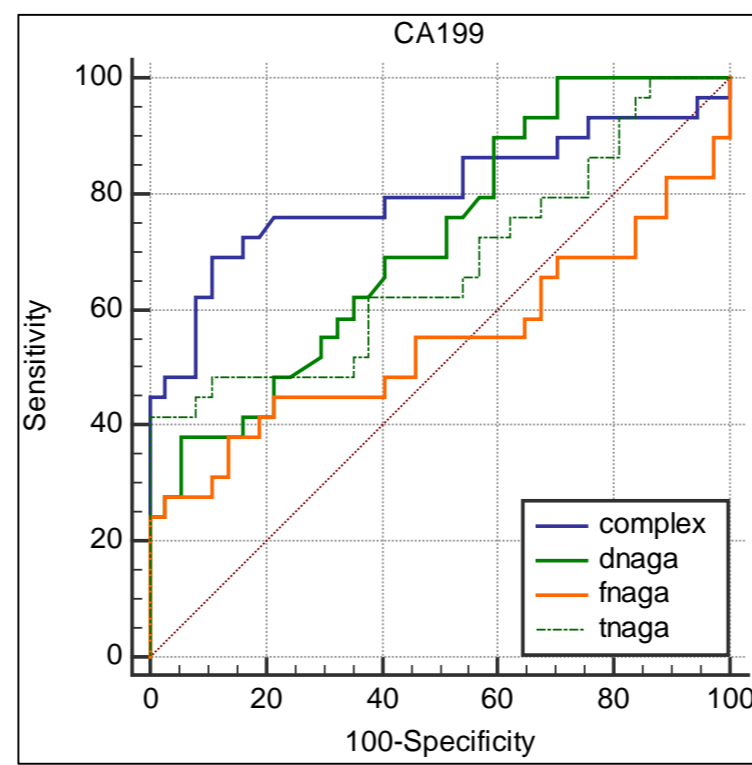
Meting	AUC	P
Complex	0,757	<0,001
fnaga	0,627	0,077
tnaga	0,803	<0,001
dnaga	0,837	<0,001



Figuur 6: ROC-curve van de verhoogde CA153 stalen

**Tabel 4: AUC en P-waarde per meting van CA153 stalen**

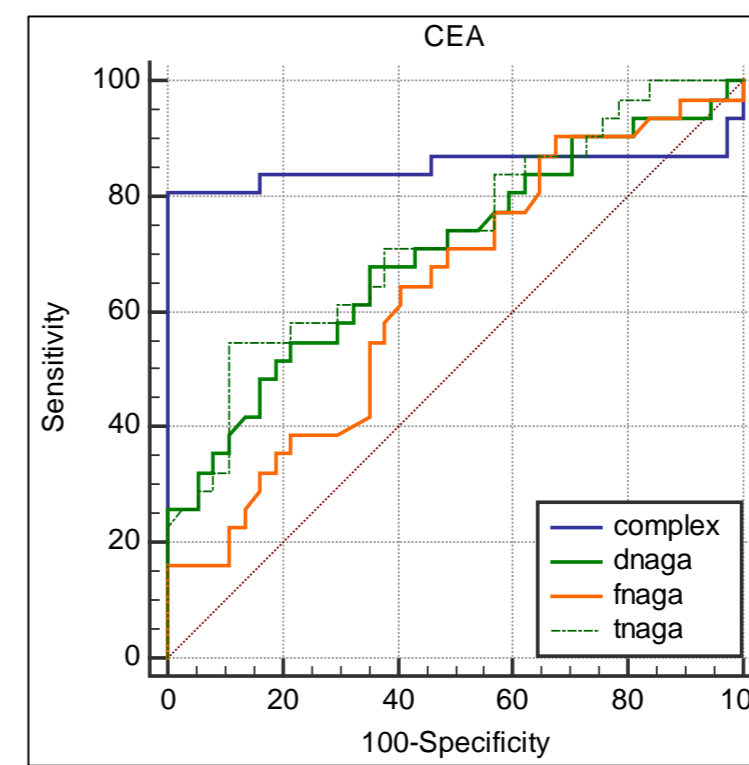
Meting	AUC	P
Complex	0,624	0,105
fnaga	0,619	0,102
tnaga	0,760	<0,001
dnaga	0,816	<0,001



Figuur 7: ROC-curve van de verhoogde CA199 stalen

**Tabel 5: AUC en P-waarde per meting van CA199 stalen**

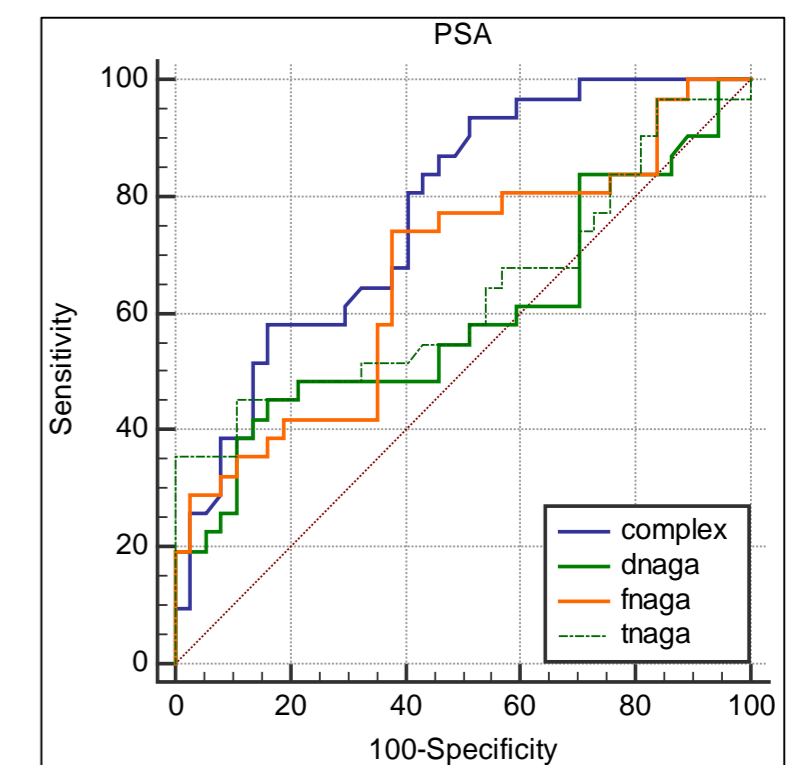
Meting	AUC	P
Complex	0,799	<0,001
fnaga	0,506	0,934
tnaga	0,654	0,024
dnaga	0,708	0,001



Figuur 8: ROC-curve van de verhoogde CEA stalen

**Tabel 6: AUC en P-waarde per meting van CEA stalen**

Meting	AUC	P
Complex	0,853	<0,001
fnaga	0,633	0,050
tnaga	0,718	<0,001
dnaga	0,690	0,003



Figuur 9: ROC-curve van de verhoogde PSA stalen

**Tabel 7: AUC en P-waarde per meting van PSA stalen**

Meting	AUC	P
Complex	0,770	<0,001
fnaga	0,668	0,013
tnaga	0,664	0,064
dnaga	0,593	0,201

## Besluit

De hypothese werd gesteld dat kankerpatiënten een hogere hoeveelheid van het nagalase-DBP-MAF-complex in het bloed hebben, maar hier wordt vastgesteld dat het omgekeerde waar is. Er is namelijk een lagere hoeveelheid complex aanwezig in het bloed van de kankerpatiënten met uitzondering van de stalen met verhoogde CEA. De totale nagalaseactiviteit is daarentegen wel hoger bij kankerpatiënten. Uit deze twee resultaten wordt geconcludeerd dat nagalase niet alleen een complex vormt met DBP-MAF, maar ook met andere stoffen afkomstig van kankercellen zoals de tumormerkers zelf.

Uit de ROC-curves wordt afgeleid dat het verschil in nagalaseactiviteit en de complexmeting goede methodes zijn om gezonde en kankerstalen te onderscheiden van elkaar, hoewel dit niet voor elke tumormerker het geval is. Met behulp van de complexmetingen kan het onderscheid gemaakt worden bij vier van de vijf tumormerkers, enkel de CA153 stalen geven geen gewenst resultaat. Ook voor het verschil in nagalaseactiviteit is het mogelijk om bij vier van de vijf kankers een onderscheid te maken. De verhoogde PSA stalen kunnen daarentegen niet met deze methode worden onderscheiden.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de complexmeting en het verschil in nagalaseactiviteit gebruikt kunnen worden om voor meerdere kankers uitsluiting te geven of de stalen effectief kankerstalen zijn. Deze kunnen wel niet gelden als algemene kankermerker aangezien niet alle kankers hiermee uitgesloten kunnen worden.

## Bibliografie

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] M. Nagpal, S. Singh, P. Chauhan en M. A. Zaidi, „Tumor markers: A diagnostic tool,” *National Journal of Maxillofacial Surgery*, nr. 7-1, pp. 17-20, 2016.
- [5] 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.

Promotoren / Copromotoren:

Dhr. Eugene Bosmans, Epsilon Biotech  
Ing. Bart Thewissen, Epsilon Biotech  
Ing. Liesbet Pauls, KULeuven