

Samenvatting

In de afgelopen jaren heeft het proteomics onderzoek zich snel ontwikkeld. Kenmerkend voor het proteomics onderzoek is dat het veel meer gaat om het karakteriseren van een verzameling eiwitten, de analyse van het systeem en niet zozeer het bekijken van een enkele component. Het succes van het humaan genoom project heeft gezorgd voor veel inzicht in verschillende ziekten op moleculair niveau. Om ziekten uiteindelijk effectief te kunnen behandelen, is het nodig dat we de dynamiek van de eiwitten die betrokken zijn bij de verschillende ziekten en hun stadia kunnen doorgronden. De volgende belangrijke uitdaging is het identificeren van de onderdelen van het humane proteoom.

De technologische ontwikkelingen op het gebied van proteomics zullen op moleculaire niveau leiden tot beter inzicht in de verschillende ziekten. De laatste decennia heeft proteomics onderzoek, met name de studie naar dynamische eiwitexpressie, post-translationele modificaties, cellulaire en subcellulaire eiwitverdeling en eiwit-eiwit interacties, gezorgd voor de identificatie van vele ziekte-gerelateerde biomarkers en nieuwe potentiële doelwitten voor medicijnen. Bij proteomics analyses worden verschillende technologieën gecombineerd, inclusief biochemie, massaspectrometrie en bioinformatica. Belangrijke technieken voor het onderzoeken van eiwitexpressie zijn: 2-dimensionale gel-elektroforese (2-DE) gecombineerd met Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS), Surface-Enhanced Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry en/of Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

Het doel van dit proefschrift is het detecteren van nieuwe potentiële biomarkers voor sarcoïdose, ankylosing spondylitis (ziekte van Bechterew) en lacunair herseninfarct door middel van het vergelijken van eiwitprofielen met SELDI-TOF-MS. In tegenstelling tot proteomics richt glycomics oftewel glycobioïlogie zich op de structuur en functie van oligosaccharides (suikerketens). Het geheel van suikerketens in een organisme wordt het glycoom genoemd. In dit proefschrift kijken we tevens naar glycosylerings defecten bij galactosemie. Patiënten met klassieke galactosemie, een aangeboren afwijking van het galactose metabolisme met secundaire glycosylerings defecten, lopen op jonge leeftijd al risico op een verminderde botdichtheid. Er is tot nu toe nog onvoldoende bewijs waardoor deze verminderde botdichtheid wordt veroorzaakt bij deze galactosemie patiënten. De hypothese die beschreven is in dit proefschrift luidt dat glycosylerings defecten van eiwitten die betrokken zijn bij het botmetabolisme een oorzaak kunnen zijn voor de verminderde botdichtheid.

Hoofdstuk 1 bevat een introductie over proteomics en glycomics. De SELDI-TOF-MS techniek wordt in dit proefschrift gebruikt om potentiële biomarkers te detecteren voor sarcoïdose, ankylosing spondylitis en lacunair herseninfarct. De

achtergronden van deze ziekten zijn opgesomd in dit hoofdstuk. Andere technieken, zoals immunoprecipitatie, gel-elektroforese en Western-blotting worden beschreven omdat ze in dit proefschrift zijn aangewend om glycosylerings defecten bij galactosemie te bestuderen.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de diagnostische waarde van eiwitprofielen verkregen met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek in verschillende studies met betrekking tot prostaat- en ovariumkanker. De pre- en post analytische aspecten van proteomics onderzoek worden in dit hoofdstuk besproken en de pre- and post analytische strategieën van de verschillende prostaat- en ovariumkanker studies worden bediscussieerd. Tevens zijn er eigen data opgenomen in dit hoofdstuk. Na vergelijking van de verschillende studies, ziet men duidelijke verschillen in de voorbehandeling en de opslag van de monsters. De effecten hiervan worden onderschat. Het is essentieel dat de monster verzameling identiek is voor de onderzochte groepen en gestandaardiseerde protocollen moeten gebruikt worden voor zowel de opwerking, opslag als de data analyse. Een belangrijke conclusie van dit hoofdstuk is dat de technische details duidelijk beschreven moeten worden in gepubliceerde wetenschappelijke artikelen, zoals de opwerkmethoden en de data analyses, voordat eiwitprofilering gebruikt kan worden als diagnostisch hulpmiddel. Een strikt gestandaardiseerd protocol is niet alleen nodig voor de pre- and post analytische aspecten, maar ook voor de kwaliteitscontrole procedures.

Hoofdstuk 3 beschrijft een standaard protocol voor de calibratie van het MALDI-TOF-MS gedeelte van de SELDI-TOF-MS. Acceptatie criteria voor de onafhankelijke gecertificeerde controlemonsters zijn opgesteld. Deze kwaliteitscontrole procedure kan ook gebruikt worden voor andere instrument typen. Door wekelijks de calibratie te controleren, werkt de kwaliteitsprocedure prospectief, terwijl in sommige studies de kwaliteitscontrolemonsters alleen worden meegenomen tijdens de experimenten, waardoor de kwaliteitscontrole retrospectief is. Zodra de onafhankelijke kwaliteitscontrolemonsters buiten de acceptatiecriteria vallen, dient er actie ondernomen te worden. Er kunnen verschillende oorzaken zijn voor de overschrijding van de acceptatiecriteria zoals; fouten die ontstaan tijdens het maken van de kwaliteitscontrolemonsters en de calibratie chip, maar ook instrumentele fouten. Elke nieuwe technologie, vooral wanneer deze wordt gebruikt als potentiële diagnostische test, heeft een strenge kwaliteitscontrole nodig om de kwaliteit van de analyse in de tijd te evalueren.

Hoofdstuk 4 geeft een overzicht van het gebruik van verschillende proteomics strategieën om potentiële en/of overeenkomstige biomarkers te detecteren bij chronische ontstekingsziekten. De verschillende proteomics strategieën en de achtergronden van de drie chronische ontstekingsziekten, multiple sclerose, reumatoïde artritis en longontsteking, worden uitgelegd in dit hoofdstuk. De geïdentificeerde en gevalideerde eiwitten worden met elkaar vergeleken om te bekijken of er overeenkomstige biomarkers zijn die gebruikt kunnen worden bij de

diagnose en prognose van de drie chronische ontstekingsziekten beschreven in dit hoofdstuk. Er worden enorm veel eiwitten geïdentificeerd en in sommige studies worden de eiwitten ook nog eens gevalideerd met andere testen. Uit deze studies blijkt dat de “heat shock protein” familie mogelijke potentiële biomarkers bevat voor multiple sclerose. Myeloid-related protein 8 wordt in drie verschillende reumatoïde arthritis studies gevonden als potentiële marker, waarbij in elke studie ook nog eens een ander soort monstermateriaal werd gebruikt. Alpha1-antitrypsin is in twee studies gevalideerd als marker voor sarcoïdose. Alpha1-antitrypsin blijkt ook een potentiële biomarker te zijn voor cystic fibrosis (CF), samen met myeloperoxidase en immunoglobuline G.

Hoofdstuk 5 is gericht op de detectie van potentiële biomarkers in serum voor de diagnose van sarcoïdose met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek. Sarcoïdose is een multi-systemische ontstekingsziekte, waarbij in 90% van de gevallen de longen zijn aangedaan. Het kenmerk van sarcoïdose is een granuloom oftewel een chronische ontstekingshaard. Tot nu toe is er nog geen goede biomarker beschikbaar om de diagnose en prognose van sarcoïdose te voorspellen. Om potentiële biomarkers te detecteren, worden de eiwitprofielen verkregen met de SELDI-TOF-MS met elkaar vergeleken. Sera van 35 sarcoïdose patiënten en 35 gezonde vrijwilligers worden in deze studie gebruikt. Het serum is voorbehandeld door gebruik te maken van anion exchange fractionering. De sensitiviteit en specificiteit die bepaald is met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek worden vergeleken met de sensitiviteit en specificiteit van de veel gebruikte bloedmarkers angiotensin convertend enzyme (ACE) and soluble Interleukin-2 Receptor (sIL-2R). Met behulp van een beslisboom algoritme, wordt een optimale classificatie bereikt met de metaal affiniteit binding arrays gekoppeld met koper (IMAC-Cu²⁺). Een separate marker met een massa/lading (m/z) waarde van 11.955 resulteert respectievelijk in een sensitiviteit en een specificiteit van 86% en 63%. Een multimarker benadering van 2 pieken, m/z waarden 11.734 en 17.377, resulteert respectievelijk in een sensitiviteit en specificiteit van 74 en 71%. Deze sensitiviteiten en specificiteiten zijn hoger vergeleken met de sensitiviteiten en specificiteiten verkregen met de ACE en sIL-2R metingen. De piek met een m/z waarde van 17.377 is succesvol geïdentificeerd als the alpha-2 keten van haptoglobine. In toekomstige studies, zullen de groepen moeten worden uitgebreid en zullen de markers ook gevalideerd dienen te worden door gebruik te maken van geblindeerde monsters. Nadat de validatie voltooid is, kunnen we kijken naar biomarkers die de activiteit van de ziekte kunnen voorspellen. Met behulp van een kwantitatieve immunoassay, kan uiteindelijk misschien een goede schatting worden gegeven van de activiteit en de ernst van het ziektebeeld sarcoïdose.

In **hoofdstuk 6** proberen we potentiële biomarkers te detecteren voor ankylosing spondylitis (AS). AS is een inflammatoire reumatische aandoening waarbij een ontstekingsreactie optreedt in de gewrichten, met een duidelijke voorkeur voor de wervelkolom. Structurele schade aan de wervelkolom kan worden aangetoond met

behulp van conventionele radiografie. Destructieve laesies zullen zichtbaar zijn die uiteindelijk leiden tot syndesmofyt formatie. Syndesmofyt is een verbening, uitgegaan van een ligament. Voor AS is dit een tussenwervelbrug. Sera van 38 AS patiënten en 38 gezonde vrijwilligers zijn gebruikt om te potentiële biomarkers op te sporen. Het serum is voorbehandeld door middel van anion exchange fractionering. Tijdens de screenings experimenten, zijn drie ProteinChip arrays met elkaar vergeleken namelijk; CM10, IMAC-Cu²⁺ en H50. Het beste onderscheid wordt bereikt met de volgende condities: CM10 ProteinChip arrays met de organische serum fractie en de IMAC-Cu²⁺ ProteinChip arrays met gedenuatureerd serum. Analyse van alle AS en controlemonsters op de CM10 arrays resulteert in een sensitiviteit van 66% en een specificiteit van 74%. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een multimarker benadering. *M/z* 4172 wordt gebruikt als eerste knoop in de beslisboom en is verhoogd in de AS groep en *m/z* 28.144 wordt gebruikt als tweede knoop. Analyse van alle AS en controlemonsters op de IMAC-Cu²⁺ arrays resulteert in een sensitiviteit en specificiteit van 70%. Hierbij wordt ook gebruik gemaakt van een multimarker benadering. *M/z* 6644 wordt gebruikt als eerste knoop in de beslisboom en is verlaagd in de AS groep en *m/z* 13.875 wordt gebruikt als tweede knoop. De pieken met een *m/z* waarde van 28.144 and 13.875 zijn beide succesvol geïdentificeerd als apolipoproteïn A-I (ApoA1). Dit is de eerste studie die laat zien dat het vergelijken van eiwitprofielen in serum met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek gebruikt kan worden om ankylosing spondylitis te diagnosticeren. In toekomstige studies worden de groepen uitgebreid en zullen de markers ook gevalideerd dienen te worden door gebruik te maken van geblindeerde monsters. Na de uitbreiding van de groepen en de validatie, kunnen we specifiek kijken naar biomarkers voor de ziekte-activiteit. Uiteindelijk is een kwantitatieve immunoassay nodig om een goede schatting te geven over de activiteit en de ernst van het ziektebeeld ankylosing spondylitis.

Het doel van de studie in **hoofdstuk 7** is het detecteren van verschillen in eiwit profielen in serummonsters van twee verschillende types herseninfarct met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek. Een herseninfarct is het gevolg van onderbreking van de bloedtoevoer naar een deel van de hersenen. Het achterliggende hersenweefsel krijgt niet meer genoeg zuurstof en dat deel van de hersenen zal beschadigen of afsterven. Een herseninfarct wordt meestal veroorzaakt door een verstopping van klein, diep gelegen arteriën in de hersenen. Er wordt onderscheid gemaakt tussen herseninfarcten waarbij een enkele symptomatische laesie is te zien en waarbij meerdere "silent" hersenlaesies te zien zijn. De herseninfarcten waarbij meerdere laesies te zien zijn, laten ook meer cerebrale witte stof zien en er is vaak sprake van een hoge bloeddruk. Deze patiënten hebben vaak ook een hogere bloeddruk, een slechtere prognose, meer kans op een tweede infarct, hogere mortaliteit op korte en lange termijn, en een grotere kans op progressie van een asymptomatische laesie. In deze studie worden twee groepen onderscheiden op grond van goed gedefinieerde criteria. Groep 1 bestaat uit acht patiënten

waarbij de hersen-MRI één enkele symptomatische hersenlaesie laat zien (type I). Groep 2 bestaat uit acht patiënten waarbij de hersen-MRI 4 of meerdere asymptomatische laesies inclusief cerebrale witte stof (type II) afwijkingen laat zien. Anion exchange fractionering wordt gebruikt om de 16 serummonsters te scheiden in verschillende fracties. Alle fracties worden op twee verschillende arrays (CIPHERGEN Biosystems Inc) gebracht; de zwakke cationenwisselaar (CM10) en de IMAC-Cu²⁺. Het meest optimaal discriminerend patroon wordt gevonden op de IMAC-Cu²⁺ ProteinChip arrays met gedenuatureerd serum. Een duidelijke potentiële marker met een *m/z* waarde van 16.122 is verhoogd in type I vs type II met een gemiddelde intensiteit van 12,5 en 5,0, respectievelijk. Eiwit identificatie wordt uitgevoerd door middel van 1- en 2-dimensionale gel-elektroforese gevolgd door MALDI-TOF-MS. De piek met een *m/z* waarde van 16.122 wordt geïdentificeerd als de alpha keten van haptoglobine. De alpha keten bestaat uit twee varianten, alpha-1 (8,9 kDa) and alpha-2 (16 kDa), de laatste komt overeen met de marker *m/z* 16.122. De totale haptoglobine concentratie en de fenotype verdeling zijn bepaald. De totale haptoglobine concentratie is niet significant verschillend voor de 2 groepen, maar de type I groep geeft een hogere haptoglobine-2 allel frequentie t.o.v. van de type II groep. In beide groepen is de haptoglobine-1 allel frequentie duidelijk hoger ten opzichte van de referentie populatie. De haptoglobine-1 allel frequentie is hoger in type II versus type I. Dit suggereert dat haptoglobine-1 een rol speelt bij het ontwikkelen van meerdere “silent” herseninfarcten met cerebrale witte stof. De associatie tussen haptoglobine-1 en herseninfarct geeft nieuwe inzichten in de genetische factoren die een oorzaak kunnen zijn voor het ontstaan van deze herseninfarcten. In toekomstige studies, zullen de resultaten moeten worden bevestigd in grotere patiënten groepen.

Hoofdstuk 8 beschrijft een in huis ontwikkelde immunoprecipitatie methode om in serum insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) en zijn isovormen te isoleren uit serum met het doel om afwijkingen van de suikerketens (glycaan abnormaliteiten) in IGFBP-3 te onderzoeken. Patiënten met klassieke galactosemie lopen risico op het verkrijgen van een verminderde botdichtheid zonder enig bewijs dat deze verminderde botdichtheid wordt veroorzaakt door voedingsfactoren. Onze hypothese is dat disglycosylatie van glycoproteïnen (eiwitten) van de growth hormone/IGF-I (insulin-like growth factor type I) as een rol speelt bij deze verstoringen. IGF-I is voor meer dan 75% gebonden aan IGFBP-3. Om glycaan abnormaliteiten te detecteren in IGFBP-3, is isolatie van dit eiwit, gevolgd door glycaan analyse nodig. Onze immunoprecipitatie methode is vergeleken met andere bestaande immunoprecipitatie methoden. Het bestuderen van IGFBP-3 isovormen is relevant voor studies op het gebied van congenitale defecten in glycosylatie, galactosemie en alcoholische levercirrose. De immunoprecipitatie methode is gevalideerd met behulp van Western-blotting en enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). De in huis ontwikkelde immunoprecipitatie methode, waarbij dimethyl pimelimidate wordt gebruikt als cross-linker, resulteert in een verbeterde

detectie van IGFBP-3 isovormen uit serum in vergelijking met bestaande immunoprecipitatiemethoden waarbij geen cross-linking wordt gebruikt. In deze studie hebben we ook een klinische validatie uitgevoerd door gebruik te maken van patiëntenmateriaal. Omdat het bekend is dat er bij patiënten met congenitale defecten in glycosylatie (CDG) type Ia sprake is van onvoldoende synthese van N-glycanen wat resulteert in een deficiënte inbouw van siaalzuur, zijn de CDG type Ia monsters gebruikt als positieve controles. Door serummonsters van kinderen met CDG type Ia en controle serum van kinderen te vergelijken, konden we een verschil zien in het patroon van de IGFBP-3 isovormen. Een verschuiving van de zure isovormen naar de basische isovormen werd gezien voor het IGFBP-3 eiwit in CDG type Ia versus controle. Deze verschuiving wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een defect in het inbouwen van siaalzuren. Dit wordt ook gezien bij andere glycoproteïnen die N-glycanen bevatten zoals transferrine. Om te bevestigen dat glycaan afwijkingen de oorzaak zijn voor de verminderde botdichtheid bij galactosemie, zullen we de IGFBP-3 isovorm patronen in galactosemie ook gaan onderzoeken.

Uit dit proefschrift blijkt dat biomarkerscreening met behulp van proteomics gevolgd door identificatie een goed diagnostisch hulpmiddel kan zijn. Echter om de verschillende analytische problemen op te lossen, is verdere ontwikkeling van de proteomics technologie noodzakelijk.