

Academiejaar 2015-2016



Faculteit Farmaceutische, Biomedische en Diergeneeskundige wetenschappen

Onderwijscommissie Biomedische Wetenschappen

Verbetering van de sensitiviteit en specificiteit van een assay voor cervixkanker, gebaseerd op biomarker combinaties uit het cervicovaginaal vocht

Door:

De Graeve Margot

Masterproef voorgelegd tot het behalen van de graad van

Master in de Biomedische wetenschappen

Promotor: Prof., Dr. Xaveer Van Ostade,

Copromotor: Prof., Dr., Dr. John-Paul Bogers,

Begeleider: Dr. Geert Van Raemdonck

Verdediging: 24 juni 2016

Proteïnechemie, proteoomanalyse en epigenetische signalisatie (PPES),

Campus Drie Eiken, Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk,

Dankwoord

Dit is het dan, de thesis is geschreven, maar een thesis maken doe je natuurlijk nooit alleen. Daarom zou ik graag een aantal mensen willen bedanken.

Eerst en vooral wil ik mijn promotor, Professor Xaveer Van Ostade bedanken voor de mooie kans die ik heb gekregen om mijn thesis te mogen starten bij deze onderzoeksgroep. Zijn inzichten en begeleiding waren zowel waardevol voor het onderzoek, als voor mij als student en hebben mij veel bijgeleerd over wetenschappelijk onderzoek. Bovendien wil ik hem en mijn begeleider Geert Van Raemdonck bedanken voor de vele verbeteringen, opmerkingen en tips die ik van hen gekregen heb.

Geert wil ik ook nog bedanken voor de goede en geduldige begeleiding. Hij stond steeds klaar met suggesties wanneer er zaken niet liepen zoals gepland. Ook al was hij zelf hard aan het werk op zijn nieuwe job in het Centrum for Proteomics, telkens wanneer ik hem nodig had, was hij bereikbaar en nam hij de tijd om mijn vragen te beantwoorden. Bedankt om zoveel tijd in mij te steken wanneer je die zelf niet altijd had.

Graag had ik ook Ruben, Joris, Mohammed, Mops en Martin bedankt voor de leuke weetjes, filmpjes en mopjes maar ook voor hun bereidheid mij te helpen waar nodig en te antwoorden op mijn vele vragen. De gezellige sfeer, die er hangt in de gehele PPES onderzoeksgroep, is een leuke bonus. Ik wens iedereen dan ook nog heel veel succes met hun onderzoek.

Wanneer resultaten of experimenten niet altijd liepen zoals gepland kon ik na een dag hard werken in het labo steeds terecht bij mijn kotgenoten. Soms was dit gewoon voor een leuke babbel, een spelletje pandemie of een tas thee, soms om mee te denken over mijn experimenten, ook al is dat niet helemaal hun 'genre'. Kristof, Wannes, Lotte, Iris en Nick, bedankt daarvoor.

Mijn ouders en zus verdienen ook een heel grote dankuwel om steeds geïnteresseerd te zijn in mijn verhalen over het labo als ik op vrijdag thuis kwam. Zonder alle kansen die ik van jullie heb gekregen, was het nooit gelukt. Alle steun en motivatie die jullie gaven, zowel in goede en slechte tijden, waardeer ik enorm.

Tenslotte wil ik Karl, mijn vriend bedanken. Wanneer de opmaak van figuren en tabellen aan het tegenwerken was stond je steeds klaar om mij de wondere wereld van Word en Excel te tonen. Bovendien was je altijd bereid te luisteren, mij te motiveren of op te vrolijken als ik aan het klagen was, maar ook om samen op tijd en stond te ontspannen. Zonder jou had ik dit nooit gekund. (Sorry als je nu meer over eiwitten en baarmoederhalskanker weet dan dat je eigenlijk wilde).

“ In science, imagination is sometimes more important than knowledge”

Albert Einstein

Inhoudsopgave

Dankwoord	I
Inhoudsopgave	II
Samenvatting.....	V
Abstract.....	VI
Afkortingenlijst	VII
Inleiding.....	1
1 Verloop van een Papilloma infectie	1
2 Screening	2
3 Vaccinatie	3
4 Biomerkers en cervicovaginaal vocht.....	3
5 Biomerkers voor baarmoederhalskanker	4
6 Voorgaand onderzoek van het labo	6
6.1 Kandidaat Biomerkers.....	7
7 Massaspectrometrie.....	8
8 Multiple reactie monitoring (MRM).....	9
8.1 MRM-studies	11
Objectieven projectvoorstel	12
Materiaal en methoden	13
1 Algemeen protocol.....	13
2 Oorsprong stalen.....	13
3 Centrifugatie van UZA-stalen.....	13
4 Indampen.....	13
5 RP-C4 chromatografie: eiwitconcentratiebepaling	13
6 Acetonprecipitatie.....	14
7 Trypsinisatie.....	15
8 Solid Phase extractie	15
9 Reversed phase C18 high performance liquid chromatography (RP-C18 HPLC)	17
10 Keuze proteotypische peptiden	18
11 ELISA	19
Resultaten	21
1 Selectie protocol SPE	21
2 Optimalisatie isotopisch gelabelde proteotypische peptiden	22
3 Vorbereiding finale multiplex analyse op de patiënten-stalen.....	25
4 Finale multiplex analyse op de patiënten-stalen	26

4.1	Spiken patiënten-stalen	26
4.2	Data-analyse multiplex experiment op patiënten-stalen	27
4.3	ROC-curves multiplex analyse op de patiënten-stalen	28
4.3.1	Onderscheid 1: ‘gezond’ versus ‘precancereus’ (LSIL + HSIL).....	29
4.3.2	Onderscheid 2: niet-risico- en risicovol voor HSIL (‘gezond’ + LSIL/ HSIL)	30
4.3.3	Onderscheid 3: Invloed van HIV.....	32
5	ACTN4 ELISA.....	32
5.1	Optimale concentratiebepaling.....	32
5.2	ACTN4 concentratiebepaling patiënten-stalen	33
5.2.1	Protocol 1: oplossen in sample diluent	33
5.2.2	Protocol 2: droogdampen en oplossen in DPBS	33
5.2.3	Protocol 3: droogdampen, wassen en oplossen in DPBS	35
6	ROC curves ACTN4.....	37
6.1	Onderscheid 1: Gezond versus precancereus (LSIL + HSIL).....	37
6.2	Onderscheid 2: niet-risico-/ risicovol voor HSIL (‘gezond’+LSIL/ HSIL)	37
	Discussie	38
1	Optimalisatie isotopisch gelabelde proteotypische peptiden	38
2	Data analyse multiplex-experiment op patiënten-stalen.....	39
3	ROC-curves multiplex-experiment op patiënten stalen	39
3.1	Onderscheid 1: ‘Gezond’ versus precancereus (LSIL + HSIL).....	39
3.1.1	Angiotensinogeen als potentiële biomarker voor onderscheid 1	40
3.1.2	LDHA als potentiële biomarker voor onderscheid 1.....	40
3.1.3	MIF als potentiële biomarker voor onderscheid 1	40
3.2	Onderscheid 2: niet risico- en risicovol voor HSIL (gezond+LSIL/HSIL).....	41
3.2.1	Angiotensinogeen als potentiële biomarker voor onderscheid 2	41
3.2.2	MIF als potentiële biomarker voor onderscheid 2	42
3.2.3	Gelsoline als potentiële biomarker voor onderscheid 2.....	42
3.2.4	14-3-3 proteïne epsilon als potentiële biomarker voor onderscheid 2.....	42
3.3	Onderscheid 3: invloed van HIV	42
4	ACTN4 ELISA.....	43
5	ROC-curves ACTN4	44
5.1	Onderscheid 1: ‘gezond’ versus ‘precancereus’ (LSIL + HSIL)	44
5.2	Onderscheid 2: niet risico- en risicovol voor HSIL (‘gezond’+LSIL/HSIL).....	44
	Conclusie en toekomstperspectieven.....	46
	Referenties	47
	Bijlagen.....	IX

1	Literatuur kandidaat biomerkers	IX
2	Optimalisatieproces 1 ^{ste} PTP Calcycline (CC29_1).....	XIII
3	Controle finale multiplex analyse.....	XVI
4	Data analyse (AUC-bepaling) 14-3-3 Proteïne epsilon in alle stalen.....	XVIII
5	Bijlage: Resultaten concentraties (pg/mg) Multiplex experiment	XX
6	ROC-curves.....	XXII
6.1	Onderscheid 1: gezond versus precancereus (LSIL + HSIL)	XXII
6.2	Onderscheid 2: Risicovol versus niet risicovol voor HSIL.....	XXIII

Samenvatting

Baarmoederhalskanker is een gynaecologische kanker met jaarlijks meer dan 450 000 nieuwe diagnoses wereldwijd. Het is de tweede meest voorkomende kanker bij vrouwen en wordt via seksueel contact overgedragen. Een persistente infectie met het hoog-risico humaan papillomavirus, een klein DNA-virus, ligt aan de basis voor het ontstaan van cervicale intra-epitheliale neoplasieën. Door de hoge prevalentie van HPV in de populatie kunnen vrouwen zich laten screenen voor het virus. Toch blijft de nood voor betere screeningsmethoden voor baarmoederhalskanker, omwille van veel vals negatieve resultaten, hoog. In deze masterproef werd getracht om biomerkers te identificeren die een onderscheid kunnen maken tussen stalen van gezonde- en precancereuze (LSIL of HSIL) patiënten. De biomerkers werden geanalyseerd uit cervicovaginale lavages (vaglav's) verkregen na colposcopie. Aangezien vaglav's op een eenvoudige, niet-invasieve manier geïsoleerd kunnen worden, vormt dit lichaamsvocht een goede bron voor biomerkers gerelateerd aan pathologieën van de vrouwelijke genitale tractus. In voorgaand onderzoek van het labo kwam ACTN4 naar voor als biomarker die hiervoor geschikt is, maar die op zichzelf een sensitiviteit en specificiteit heeft van 86%. Dit is niet voldoende om een diagnostische test te kunnen opstellen. Er zijn echter nog meer eiwitten aanwezig in het cervicovaginaal vocht (CVV) die de rol van biomarker voor cervixkanker kunnen opnemen. Er werd tijdens deze masterthesis dan ook gestreefd om de sensitiviteit en specificiteit van deze kandidaat biomerkers na te gaan zodat er uiteindelijk mogelijke combinaties gevormd kunnen worden met ACTN4 waardoor de gecombineerde sensitiviteit en specificiteit zal stijgen. Screening van het CVV op de aanwezige concentratie ACTN4 gebeurde via ELISA, de andere potentiële biomerkers werden getest door middel van Multiple reactie monitoring (MRM), een techniek met nagenoeg dezelfde gevoeligheid als ELISA. De 29 CVV stalen die gebruikt werden zijn afkomstig van gezonde- en HPV of HIV geïnfecteerde vrouwen en van vrouwen die al in een bepaald voorstadium van baarmoederhalskanker zitten. Op al deze stalen werden de volgende 11 eiwitten onderzocht: Calcycline, Calgranuline B, Calpastatine, Lactaat dehydrogenase (LDHA), Proteasoom activator subunit 1 (PSME1-, 14-3-3 proteïne epsilon, F-actine capping proteïne subunit alfa 2, Cathepsine B, Gelsoline, Angiotensinogeen en Macrofaag migratie inhibitie factor (MIF). Voor elk peptide werd er een 'Receiver operating characteristic' of ROC-curve opgesteld en dit bij twee verschillende onderscheidingen: 'gezond'/precancereus (LSIL + HSIL) en niet risicovol/ risicovolle stalen (HSIL). Er werd ook steeds een discriminatiedrempel opgesteld uitgedrukt in pg/mg. Voor het eerste onderscheid tussen 'gezonde' en precancereuze patiënten werden er drie eiwitten gevonden, namelijk: Angiotensinogeen, LDHA en MIF. De sensitiviteit, specificiteit en accuraatheid van deze kandidaat biomerkers op zichzelf was echter niet voldoende om een diagnostisch assay te kunnen opstellen. Voor het tweede onderscheid tussen niet risico- en risicovolle patiënten werden er drie goede kandidaat biomerkers gevonden die deze discriminatie kunnen maken: Angiotensinogeen, MIF en 14-3-3 proteïne epsilon. Ook hier kan geconcludeerd worden dat deze merkers op zichzelf niet voldoende sensitiviteit, specificiteit en accuraatheid geven voor dit onderscheid. ACTN4 werd d.m.v. ELISA ook voor beide onderscheidingen getest. Na optimalisatie van de ELISA, door pH neutralisatie, vond men binnen deze masterproef dat deze biomarker op zichzelf nu een sensitiviteit, specificiteit en accuraatheid van 100% heeft om 'gezonde' patiënten correct van precancereuze patiënten te kunnen onderscheiden (1^e onderscheid). Voor het 2^{de} onderscheid bekamen we een accuraatheid van 94%, sensitiviteit van 80% en specificiteit van 70% voor ACTN4 om niet risico- en risicovolle patiënten te onderscheiden. Deze onderscheiding werd voor de eerste maal aangetoond. Om deze sensitiviteit, specificiteit en accuraatheid te doen stijgen tot 100% werd er een combinatie tussen ACTN4 en 14-3-3 proteïne epsilon opgesteld om deze waarden te verbeteren. De voorwaarde voor een goede combinatie assay werd ingesteld op: minstens één van de twee eiwitten moet boven de discriminerende *cutoff*-waarde liggen om als HSIL-staal gedefinieerd te worden. Aan deze voorwaarde werd voor alle geteste stalen voldaan. Verder onderzoek is absoluut noodzakelijk om alle resultaten in de toekomst definitief te kunnen bevestigen omdat de geteste steekproefgrootte van 16 stalen te klein was. Enkele hoopvolle stappen richting een diagnostische, al dan niet combinatie assay, voor cervixkanker op basis van biomerkers uit het cervicovaginaal vocht, zijn in deze masterproef gezet.

Abstract

Each year, there are more than 450.000 newly diagnosed patients with cervical cancer worldwide. It is the second most common cancer for women, and is transmitted by sexual contact. A persistent infection with the high-risk human papillomavirus (HPV), a small DNA-virus, will lead to the formation of cervical intraepithelial neoplasia. Due to the high prevalence of HPV in the population, there are already screening methods available. These screenings methods however, are highly sensitive to false negative results which increases the need for better methods. With this thesis, we aimed to identify new biomarkers that can discriminate between samples of healthy persons and samples of precancerous patients (LSIL + HSIL). Biomarkers were analysed from cervicovaginal lavages (Vaglavs), obtained from colposcopy. In previously performed research, ACTN4 was detected as a biomarker with high accuracy, sensitivity and specificity for the discrimination between healthy people and precancerous patients. But unfortunately, it was not high enough for clinical, diagnostic applications. That is why we analysed cervicovaginal fluid (CVF) to find other potential biomarkers for cervical cancer. Using multiplex reaction monitoring (MRM), we quantified 11 proteins in 29 CVF-samples: Calcyclin, Calgranulin B, Calpastatin, Lactate dehydrogenase A (LDHA), Proteasome activator subunit 1 (PSME1), 14-3-3 protein epsilon, F-actin capping protein subunit alpha 2, Cathepsin B, Gelsolin, Angiotensinogen and Macrophage migration inhibition factor (MIF). ACTN4 concentration was measured with ELISA. From all these results, ROC-curves were made to help identify the *cut-off* value, sensitivity, specificity and accuracy for each peptide for at given discriminative condition. Two conditions were tested: first condition: healthy versus precancerous (LSIL +HSIL) and the second condition: people at risk for developing cervical cancer (HSIL) versus people with lower risk (LSIL+ healthy)). For the first discriminative condition, three proteins (Angiotensinogen, MIF and LDHA) were found that could be used as a potential biomarker. The sensitivity, specificity and accuracy of the individual candidate biomarkers was not sufficient to use them in a diagnostic assay. But, after optimisation of the ACTN4-ELISA assay by neutralizing the pH, ACTN4 had a sensitivity, specificity and accuracy of 100%. For this first distinction a combination assay is not needed because ACTN4 on its own can perfectly discriminate between healthy persons and precancerous patients. However, the ACTN4 assay was only tested on 16 samples, demanding for further research in order to confirm this result on a larger scale. For the second condition, the following three proteins were also found: Angiotensinogen, MIF and 14-3-3 protein epsilon. Here, as for the first condition, the sensitivity, specificity and accuracy of the individual candidate biomarkers was not sufficient enough to use them in a diagnostic assay. When we examined ACTN4 for this distinction, we found an accuracy of 94%. It was the first time that ACTN4 could be used to discriminate between low risk patients and high risk patients. To increase the sensitivity, specificity and accuracy to 100%, we choose a combination assay between ACTN4 and 14-3-3 protein epsilon. Here, 'at least one of the two proteins needed to be above the *cut-off* values' in order to define the sample as high-risk'. Using those criteria, we could conclude that a combination between ACTN4 and 14-3-3 protein epsilon is sufficient to discriminate between high and low risk patients with 100% accuracy. However, testing this combination on more samples is needed because the sample set we used was too small to make a definitive conclusion.

Afkortingenlijst

Afkorting	Verklaring
2-DE	2-Dimensionele gelelektroforese techniek
2D-DIGE	2 Dimensionele differentiële gelelektroforese techniek
ACN	Acetonitril
ACTN4	Alfa-actinine-4
AD	Adenocarcinoma
Ang II	Angiotensine II
Anxa4	Annexine A4
AUC	Area/absorption under the curve
AZ	Aminozuur
BSA	Bovine serum albumine
Ca ²⁺	Calciumionen
Capza2	F-actine capping protein subunit alpha
CaSki	Epidermoide cervicale carcinoma cellen
CC	Cervixkanker
CIN	Cervicale intra-epitheliale neoplasieën
Cu ⁺	Koperion
CVV	Cervicovaginaal vocht
CYTB	Cystatine B
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline oplossing
DTT	Dithiothreitol
E6	Viraal oncoproteïne E6
E7	Viraal oncoproteïne E7
EC	Endometriumkanker
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray ionisatie
eV	Elektronvolt
Fc-deel	Constant deel van immunoglobuline
GSN	Gelsoline
HaCaT	een spontaan getransformeerde aneuploïde cellijn van keratinocyten
HDAC1	Histon deacetylase 1
HeLa	Cervixkanker cellijn afkomstig van Henrietta Lacks
HPLC	High performance liquid chromatography
HPV	Humaan papillomavirus
hrHPV	Hoog-risico humaan papillomavirus
HRP	Horseradisch peroxidase
HSIL	Hoge graad squameuze intra-epitheliale laesie
ICAL	Calpastatine
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
kDa	kilo dalton
LDHA	Lactaat dehydrogenase A
LFA	Lateral flow immunoassay
lrHPV	Laag-risico humaan papillomavirus

LSIL	Lage graad squameuze intra-epitheliale laesie
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionisation
MHC I	Major histocompatibility complex 1
MIF	Macrofaag migratie inhibitie factor
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massaspectrometrie
NAD+	Nicotinamideadeninedinucleotide
NADH	Gereduceerd nicotinamideadeninedinucleotide
OC	Ovariumkanker
p21	Cycline dependent kinase inhibitor 1
p53	Tumor supressor eiwit 53
PAP-test	Papanicolaou test
PCR	Polymerase chain reaction
PDIA3	Proteine disulfide-isomerase A3
PGAM1	fosfoglyceraat mutase 1
PLNM	Pelvische Lymfekliermetastasen
pRb	Retinoblastomaproteïne
PSME1	Proteasoom activator complex 1
p-waarde	Overschrijdingskans
Q1	Eerste quadrupool
q2	Tweede quadrupool
Q3	Derde quadrupool
ROC-Curve	Receiver operating characteristic
RP-C18	Reverse Phase C18
S100A6	Calcycline
S100A9	Calgranuline B
SCC	Squameus cel carcinoom
SELDI	Surface enhanced laser desorption/ionisation
TFA	Trifluorazijnzuur
TIC	Total ion count
TripleQ	Massaspectrometrie techniek met 3 quadrupolen na elkaar
TGF- β	cytokinetransforming growth factor- β
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TOF	Time of flight-buis
UZA	Universitair ziekenhuis Antwerpen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLP	Virus-like partikel
WCX	Weak cation exchange
WR	Working reagent

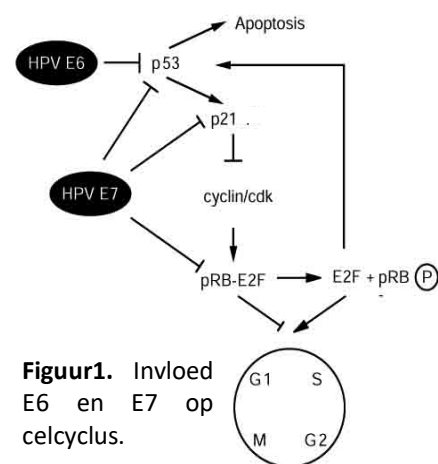
Inleiding

Baarmoederhalskanker is een gynaecologische kanker met jaarlijks meer dan 450 000 nieuwe diagnoses wereldwijd. Het is de tweede meest voorkomende kanker bij vrouwen en wordt veroorzaakt door het hoog-risico humaan papillomavirus (Bodily and Laimins, 2011). De overdracht van dit virus gebeurt voornamelijk via seksueel contact (Stanley, 2010). 80% van de vrouwen wereldwijd zal ooit een infectie met HPV doormaken, toch kan 40-70% van deze geïnfecteerde vrouwen de infectie subklinisch, zonder waarneembare symptomen, klaren. Wanneer een infectie langer dan 18 maanden aanhoudt, wordt deze persistent genoemd. Dit komt bij 10% van de geïnfecteerde vrouwen voor (Bodily and Laimins, 2011). Door een toegenomen blootstelling aan het hoog-risico humaan papillomavirus (hrHPV) en door een minder effectieve screening is de incidentie en het sterfterisico van baarmoederhalskanker groter in ontwikkelingslanden dan in de westerse wereld.

Huidige screening-assays voor de detectie van baarmoederhalskanker vertonen echter belangrijke beperkingen die verder in onderstaande tekst worden besproken. Daarom is er vandaag de dag een duidelijke vraag naar een betere screeningsmethode die ook toepasbaar is in derde wereldlanden. Voorgaand onderzoek binnen onze onderzoeksgroep heeft kandidaat biomerkers voor baarmoederhalskanker geïdentificeerd in het cervicovaginaal vocht. Tijdens deze thesis zal voor 15 van deze eiwitten verder onderzocht worden of ze kunnen bijdragen aan een diagnostische test, om een beter specificiteit en sensitiviteit te bekomen in de opsporing van baarmoederhalskanker.

1 Verloop van een Papilloma infectie

Papillomavirussen zijn kleine DNA-virussen zonder enveloppe die plaveiselepitheel of huidepitheel kunnen infecteren. Er zijn meer dan 120 verschillende HPV-types: 33% heeft de genitale tractus als target. De overige 67% komt voornamelijk op het huidepitheel voor. De groep virussen die de genitale tractus infecteert, kan ingedeeld worden in hoog-risico HPV-types (hrHPV) en laag-risico HPV-types (lrHPV) (Bodily and Laimins, 2011). De lrHPV, voornamelijk HPV6 en HPV11, zullen genitale wratten veroorzaken terwijl hrHPV potentieel oncogeen is (Stanley, 2010). De twee belangrijkste types hrHPV: HPV16 en HPV18, zijn in 70% van de gevallen verantwoordelijk voor het ontstaan van een plaveiselcarcinoom in de baarmoederhals (Dijkstra et al., 2014).

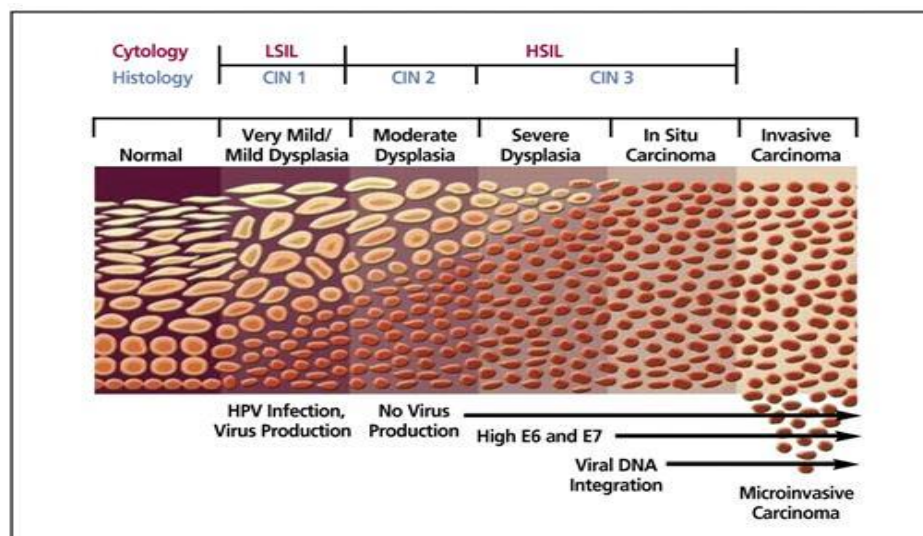


Figuur1. Invloed E6 en E7 op celcyclus.

Om baarmoederhalskanker te ontwikkelen is er een persistente hrHPV-infectie nodig, waarbij het virus voldoende virale oncoproteïnen produceert (Cuzick et al., 2008). E6 en E7 zijn hiervan de belangrijkste. E6 vertoont interactie met onder andere p53 en E7 met pRb (Retinoblastomaproteïne). p53 en pRb zijn beiden tumorsuppressoreiwitten die inwerken op de celcyclus en een negatieve invloed uitoefenen op de celdeling. E6 bindt en inhibeert p53 waardoor de celcyclus in de S-fase zal stoppen en apoptose vermeden wordt (Deligeoroglou et al., 2013). E7 bindt en inactieveert pRb, door de interactie tussen pRb en E2F te verhinderen met tumorgenese tot gevolg. Daarnaast inhibeert E7 ook p21, een cycline-dependente kinase inhibitor (CKI) dat bij stress stimuli voor een G1-fase celcyclus arrest zal zorgen. De expressie van p21 wordt bovendien sterk gecontroleerd door p53. Bij het proces van baarmoederhalskanker spelen E6 en E7 dus een rol in de maligne transformatie van het cervicale epitheel (figuur 1) (Higareda-Almaraz et al., 2011)

Als een infectie niet direct geklaard wordt, kunnen er cervicale intra-epitheliale neoplasieën (CIN) ontstaan. Afhankelijk van de mate van dysplasie zijn er verschillende graden van laesie mogelijk: CIN1, CIN2 en CIN3. Dit zijn voorstadia van cervixkanker. Als de laesie voornamelijk in de onderste basale lagen van het epitheel gesitueerd is, spreekt men van CIN1 of een lage graad squameuze intra-epitheliale laesie (LSIL). Ondanks het relatief normale uitzicht van de cellen is er hierbij sprake van milde dysplasie. Ongeveer 1/3 van de cellen in de baarmoederhals zijn abnormaal. CIN1 wordt in 80%

van de gevallen nog geklaard door het lichaam (Martin-Hirsch and Wood, 2011). Naarmate de laesie meer in de middelste tot bovenste epitheliale lagen van de cervix voorkomt, spreekt men van CIN2 of hoge graad squameuze intra-epitheliale laesie (HSIL). Hierbij treedt matige dysplasie op, ongeveer 2/3 van de cervixcellen zijn abnormaal. Het kan zowel een banale HPV infectie voorstellen als een tussenstap naar CIN3. CIN3 is een beter reproduceerbare diagnose, en reflecteert beter het echte kankerrisico dan CIN2. Bij CIN3, wanneer bijna alle cervixcellen abnormaal zijn, spreekt men van ernstige dysplasie. De cellen hebben nu ook een abnormaal uitzicht. Dit is het equivalent van de meest vergevorderde precursor van het plaveiselcelcarcinoom van de cervix. Ook hier wordt nog spontane normalisatie gezien, maar de kans op evolutie naar maligniteit is vrij groot. CIN1 kan bij een persistente infectie met hrHPV verder ontwikkelen tot CIN2 en CIN3 en ten slotte tot een maligne cervixcarcinoom (Figuur 2). Dit hele ontwikkelingsproces duurt doorgaans meer dan tien jaar (Martin-Hirsch and Wood, 2011).



Figuur 2. De verschillende stadia vanaf een persistente hrHPV infectie tot een invasief cervixcarcinoom. CIN: cervicale intra-epitheliale neoplasie. E6 en E7: de belangrijkste virale oncoproteïnen. HSIL: hoge graad squameuze intra-epitheliale laesie. LSIL: lage graad squameuze intra-epitheliale laesie (Lowy en Schiller, 2006).

2 Screening

Door de hoge prevalentie van HPV kunnen vrouwen zich laten screenen voor het virus. Cervixcytologie of een uitstrijkje is de eerste stap in het screeningsproces. Met cervixcytologie bedoelt men zowel de conventionele cytologie (de Papanicolaou test) als de nieuwere "liquid-based" cytologie. Het staal wordt verzameld met een borsteltje en bij conventionele smear direct overgebracht op een microscopieglasje, terwijl het staal bij *liquid based* cytologie opgeslagen wordt in bewaringsbuffer. Op het labo zal men dan het staal zo behandelen dat cel fragmenten en mucus verwijderd worden vooraleer men ook voor deze stalen een cytologie slide maakt (Ronco et al., 2006). De bekomen resultaten zijn meer accuraat. De sensitiviteit van cervixcytologie varieert tussen 56-98,6%. De specificiteit van de cytologie varieert tussen 57,3-64%. Dit is beduidend lager dan de sensitiviteit, maar past binnen de vereisten van een goede screeningstest (Karimi-Zarchi et al., 2013). Bij een uitstrijkje zoekt men naar afwijkende cellen in het slijmvlies van de overgangscervix (Baker, 2013). Als het resultaat negatief is, wordt er pas na drie jaar een nieuw uitstrijkje afgenomen. Als er toch afwijkende cellen aanwezig zijn, wordt er binnen het jaar een nieuw uitstrijkje opgevraagd. Omdat het lichaam het virus zelf kan klaren zal het tweede uitstrijkje in 80% van de gevallen weer normaal zijn. Als er echter sprake is van een persistente infectie of progressie naar HSIL zal de patiënt direct worden opgevolgd met een colposcopisch onderzoek. Dit onderzoek gebeurt om een diagnose te stellen en wordt niet gebruikt bij screening, de prevalentie van cervixafwijkingen is daarvoor te laag en zou tot veel vals positieven leiden (Cantor et al., 2008). De baarmoederhals wordt dan gespoeld met een 5%

azijnzuuroplossing die voor een reversibele coagulatie van eiwitten en cytokeratine zal zorgen (Verguts J., 2011). Premaligne en maligne epitheel zal nu wit aan kleuren. De volgende stap is het aanbrengen van een Lugol-oplossing. Dit wordt de Schillertest genoemd. Normaal plaveiselcelepitheel is rijk aan glycogeen dat homogeen bruin kleurt na contact met de Lugol-oplossing. Premaligne cellen bevatten minder glycogeen en zullen dus minder kleuren. Deze coagulatie en kleuring kan dan bestudeerd worden via een 25x vergrotende camera. Als er een hooggradig letsel gevonden wordt, zal er een punchbiopt van genomen worden om de diagnose anatomopathologisch te bevestigen. Zo bekomt men bij één patiënt drie onderzoeksresultaten: dat van de cytologie (het uitstrijkje), de colposcopie en de histologie (de biopsie) (Chevolet and Gerris, 2009). Door het invoeren van deze screeningsmethoden is er een daling in het aantal cervixcarinomen opgetreden (Dickson et al., 2015). Desondanks zijn vals negatieve resultaten geen uitzondering, waardoor vrouwen na screening toch nog baarmoederhalskanker kunnen ontwikkelen. Als verklaring wordt de verminderde sensitiviteit van de PAP-test voor de detectie van CIN2 en CIN3 gegeven. Deze is namelijk maar 53,0% ten opzichte van HPV-DNA-testen met een sensitiviteit van 96,1% (Cuzick et al., 2006). Deze HPV-DNA test houdt een genotypering van het virus via PCR in. De primers die gebruikt worden zijn gebaseerd op L1, een HPV kapselwit en E6-7. HPV genotypering heeft een hoge sensitiviteit maar een lage specificiteit. De sensitiviteit van colposcopie (64-99%) ligt ook hoger dan deze van cytologie. Dit is te verklaren door het feit dat voornamelijk vrouwen met een vermoeden van maligniteit colposcopisch verder worden onderzocht. De specificiteit van colposcopie varieert tussen 30% en 93% (Chevolet and Gerris, 2009).

3 Vaccinatie

Voor vrouwen die nog nooit met hrHPV besmet zijn geweest, bestaan er drie vaccins ter preventie van baarmoederhalskanker: het quadrivalente en nonavalente Gardasil® vaccin van Merck en het bivalente Cervarix® vaccin van GlaxoSmithKline (HPV 16 en 18). De vaccins zijn niet therapeutisch, dus regelmatige controle met uitstrijkjes blijft noodzakelijk. Deze vaccins hebben een doeltreffendheid van meer dan 99%, maar zijn enkel behulpzaam als vrouwen, welke nog nooit met HPV zijn geïnfecteerd, worden ingeënt. Vandaar dat men het vaccin toedient nog voor hun eerste seksuele contact (Armstrong, 2010). Een van de twee vaccins van Merck, namelijk het nonavalente (9vHPV), wordt het meest gebruikt. 9vHPV is een niet-infectieus, virus-like partikel vaccin dat virale, structurele proteïnen van de volgende HPV-types bevat: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 en 58 en in drie vaccinatiebeurten wordt toegediend. De eerste vier types zitten ook in het quadrivalente vaccin. Het vaccin kan ook worden voorgeschreven voor mannen tussen 19-26 jaar (Petrosky et al., 2015). Het HPV vaccin moet dus beschouwd worden als een waardevolle toevoeging aan de preventie van het cervixcarinoom, naast het bestaande screeningsprogramma. Uit een rapport van het Federaal Kenniscentrum voor Gezondheidszorg blijkt dat als er geen screening naar cervixkanker zou zijn, elke seksueel actieve vrouw een kans van 1 op 28 heeft om een cervixcarinoom te ontwikkelen. Een goed screeningprogramma kan dit cijfer herleiden naar 1 op 217. Enkel vaccinatie (gesteld dat deze levenslang bescherming biedt), zonder screening, verkleint de kans naar 1 op 70. De combinatie van screening en vaccinatie ten slotte reduceert het risico tot 1 op 556 (Chevolet and Gerris, 2009). De nood aan alternatieve screeningsmethoden, die een hogere sensitiviteit voor baarmoederhalskanker hebben, blijft toch bestaan omdat er enerzijds nog een hele generatie vrouwen is die deze vaccins niet hebben gekregen en anderzijds het gevaar bestaat dat de minder oncogene hoog-risico HPV-types nu vaker in de populatie kunnen opkomen en zo voor een verhoogde oncogeniciteit van dat type zorgen (Paxton A., 2013). Het gebruik van biomerkers uit het cervicovaginaal vocht wordt daarom overwogen als sensitief en gebruiksvriendelijk alternatief voor het uitstrijkje.

4 Biomerkers en cervicovaginaal vocht

Biomerkers zijn meestal eiwitten die een indicatie geven over de biofysiologische staat waarin een cel of weefsel verkeert. Zo kan er een onderscheid gemaakt worden tussen fysiologische condities in een bepaald (ziekte)proces (Silberring and Ciborowski, 2010). Een ideale biomarker moet zeer sensitief en specifiek zijn. Sensitiviteit is een maat die weergeeft hoe goed een positieve test correleert met de aanwezigheid van ziekte in een patiënt. Het zijn het aantal baarmoederhalskankerpatiënten met een

verhoging van expressie van een merker ten opzichte van alle baarmoederhalskankerpatiënten in de populatie. Specificiteit van een test wordt verklaard als het aantal niet-zieke patiënten met een negatieve test voor deze merkers, ten opzichte van alle gezonde personen in de populatie (figuur 3). De specificiteit wordt dus bepaald door het aantal gezonde personen die ook door de test als gezond worden aangeduid. Verder moet het aantal vals positieve resultaten in een studie met de merker laag zijn. Vals positieven zijn personen die gezond zijn maar door de test toch incorrect als ziek worden geïdentificeerd (Tambor et al., 2010).

		Condition (as determined by "Gold standard")		
		Condition positive	Condition negative	
Test outcome	Test outcome positive	True positive	False positive (Type I error)	Precision = $\frac{\Sigma \text{ True positive}}{\Sigma \text{ Test outcome positive}}$
	Test outcome negative	False negative (Type II error)	True negative	Negative predictive value = $\frac{\Sigma \text{ True negative}}{\Sigma \text{ Test outcome negative}}$
		Sensitivity = $\frac{\Sigma \text{ True positive}}{\Sigma \text{ Condition positive}}$	Specificity = $\frac{\Sigma \text{ True negative}}{\Sigma \text{ Condition negative}}$	Accuracy = $\frac{\Sigma \text{ True positive} + \Sigma \text{ True negative}}{\Sigma \text{ Total population}}$

Figuur 3. Een overzicht van sensitiviteit, specificiteit, accuraatheid, vals positieve en vals negatieve resultaten (Valkenborg N. and Van Ostade X., 2014a).

Ook het cervicovaginaal vocht (CVV), dat is verzameld via lavage tijdens colposcopie, kan (proteïne-) biomerkers bevatten. Omdat CVV in direct contact staat met het cervixepitheel, zal het proteoom specifiek en minder complex zijn dan bij biomerkers die verkregen zijn via bloedafname. Bovendien is het volume dat via een lavage verkregen wordt kleiner dan dat van bloedplasma, waardoor de proteïnen minder verdund worden. Het gebruik van biomerkers uit het CVV heeft als nadeel dat ze mogelijk onderhevig zijn aan inter- en intra-individuele variabiliteit door infecties, leeftijd, hormonale veranderingen tijdens de menstruele cyclus of het gebruik van anticonceptiva (Zegels et al., 2009). Bijgevolg zijn sterk variabele eiwitten niet meer geschikt als potentiële biomarker. Het CVV vormt een eerste natuurlijke verdedigingsbarrière om de genitale tractus te beschermen tegen verschillende micro-organismen (Cole, 2006a). Ondanks de inter- en intra-individuele variatie, is deze lichaamsvloeistof een goede bron van proteïnen, die dankzij het directe contact met de epitheelcellen van de cervix, een beeld kunnen schetsen van de infectieuze status of neoplasie van het cervixweefsel. Maar er zijn ook enkele zaken die onduidelijk blijven bij biomarker-onderzoek, ongeacht de oorsprong van het staal. Ten eerste is het niet altijd duidelijk hoe de regulatie van de eiwitten in de weefsels wordt vertaald naar de plaats van staalafname. Ten tweede kan het zijn dat de opregulatie van eiwitten niet direct is gerelateerd met de pathologie die wordt onderzocht. Als laatste kan de grote concentratie van de verschillende eiwitten voor een probleem zorgen, waarbij de detectie van eiwitten in de ng/ml range bemoeilijkt kan worden (Boichenko et al., 2014).

5 Biomerkers voor baarmoederhalskanker

Er zijn reeds verschillende publicaties beschikbaar die, gebaseerd op proteoomanalyse, een biomarker trachten te vinden ter verbetering van de sensitiviteit en selectiviteit van huidige screeningsmethodes voor baarmoederhalskanker. Gezien de enorme verschillen in zowel het type staal als de technieken die toegepast worden, zijn de resultaten van de proteoom-analytische studies sterk uiteenlopend. Enkele voorbeelden hiervan worden besproken en in onderstaande tabel samengevat (Tabel 1).

Tabel 1. Overzicht van reeds uitgevoerde proteoomstudies ter identificatie van potentiële biomerkers voor cervixcarcinomen. (MS: Massaspectrometer; 2-DE: 2-Dimensional Gel Electrophoresis; 2D-DIGE: 2-Dimensional Difference Gel Electrophoresis; WCX: Weak Cation Exchange; MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation; SELDI: Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation; TOF: Time of Flight; HPV: Humaan Papillomavirus; CC: cervixcarcinoom; SCC: Squameus cervixcarcinoom, CIN3: Cervicaal Intra-epitheliale Neoplasie; HSIL: High-grade Squamous Intraepithelial Laesie.

Type staal	Publicatie	Subgroepen	Scheidings-en detectie techniek
Cellijn	(Merkley et al., 2009; Merkley et al., 2009)	Humane keratinocyten met oncoproteïne expressie: HPV16 E6/ HPV16 E7/ HPV16 E6 + E7/ Controle(primaire keratinocyten)	2D- DIGE + MALDI-TOF
	(Higareda-Almaraz et al., 2011)	7 Verschillende cellijnen: 2x HPV 16+/ 2x HPV 18+ / 2x HPV- /Controle (primaire keratinocyten)	2-DE MALDI-TOF
Plasma	(Lin et al., 2006)	In situ CC/ invasief CC/gezond	WCX + SELDI-TOF
	(Jeong et al., 2008)	SCC/ gezond	2-DE + MALDI-TOF
	(Looi et al., 2009)	CIN3/ SCC/ gezond	WCX + MALDI-TOF/ TOF
	(Guo et al., 2015)	CC (Stage Ia)/ gezond	2D-DIGE + MALDI-TOF
Serum	(Liu et al., 2011)	CC (Stage Ia-IIb)/ gezond	WCX + MALDI-TOF
	(Boichenko et al., 2014)	CIN/ LSIL/ HSIL/ gezond	UHPLC- QQQ- LC-MS/MS
	(Liu et al., 2015)	CIN1/ SCC/ gezond	WCX +MALDI-TOF
Cervicaal weefsel	(Wong et al., 2004)	CC/ gezond	WCX + SELDI-TOF
	(Choi et al., 2005)	CC HPV16+ /CC HPV18+ /HaCaT cellijn (controle)	2DE + MALDI-TOF
	(Bae et al., 2005)	SCC/ gezond	2DE + MALDI-TOF
	(Zhu et al., 2009)	SCC/ gezond	2DE + MALDI-TOF/TOF
	(Arnouk et al., 2009)	HSIL/ CC/ gezond	2D-DIGE + MALDI-TOF
	(Hwang et al., 2009)	CC/ gezond	2DE + MALDI-TOF
	(Barba-de la Rosa AP et al., 2012)	SCC/ gezond	2DE + MALDI-TOF
	(Song et al., 2012)	SCC/ gezond	2DE + MALDI-TOF
	(Zhao et al., 2015)	CIN/ SCC/ gezond	2D-DIGE + MALDI-TOF/ TOF
	(Mohammed et al., 2016)	CIN2-3/ invasief CC /gezond	2DE + MALDI-TOF
Urine	(Mu et al., 2016)	CC/ gezond	WCX + SELDI-TOF

6 Voorgaand onderzoek van het labo

In een voorgaande studie van het labo werd het proteoom in CVV (cervicovaginaal vocht) stalen afkomstig van zes gezonde vrouwen (normale colposcopie en HPV negatief) en zes vrouwen met verschillende stadia van precancereuze laesies onderzocht via LC-MS/MS (Van Raemdonck G., 2014). Vervolgens werd via een label-vrije *spectral count* methode onderzocht welke verschillen in eiwitabundantie tussen de gezonde en precancereuze stalen significant waren. Hierbij werden er 341 verschillende eiwitten gevonden bij de gezonde en 371 bij de precancereuze vrouwen. Van al deze eiwitten waren er 103 unieke eiwitten aanwezig bij de gezonde vrouwen en 133 bij de precancereuze. De andere 283 gevonden eiwitten overlaptten met elkaar en werden dan ook niet verder meegenomen in de studie. Er werd immers naar eiwitten gezocht die het onderscheid in (patho-) fysiologische status van de vrouw het best representeren. Uit de statistische analyses vond men dat Alfa-actinine-4 (ACTN4), met een p-waarde van 0,001, in alle stalen van de precancereuze vrouwen aanwezig was en niet in stalen van de gezonde vrouwen. Deze kandidaat biomarker werd dan gevalideerd door middel van een ELISA. Levels van ACTN4 waren significant hoger in stalen van HR-HPV geïnficeerde vrouwen vergeleken met stalen van gezonde, niet HR-HPV geïnficeerde vrouwen (p-waarde: 0,023). Dit resultaat bevestigde dus de LC-MS/MS data. Bovendien hadden LR-HPV geïnficeerde patiënten een hogere ACTN4 concentratie vergeleken met non-HPV geïnficeerde patiënten (p-waarde: 0,052), maar een lagere concentratie ten opzichte van de HR-HPV geïnficeerde patiënten. Ook bij de vergelijking tussen HPV-geïnficeerde patiënten en ‘gezonde’ patiënten zag men een significant verschil (p-waarde: 0,009) in de ACTN4-concentratie. De hoogste concentratie bij de ‘gezonde’ patiënten was 17,3pg/ml terwijl de laagste concentratie bij de HR-HPV geïnficeerde patiënten op 30,6pg/ml lag. De ACTN4 –concentratie van de LR-HPV patiënten ligt er tussen in, namelijk 21,3pg/ml. Dit is meer dan de hoogste concentratie bij ‘gezonde’ patiënten. Op basis van deze gegevens werd een *cutoff*-waarde van 18pg/ml genomen om stalen van zieke van ‘gezonde’ patiënten te kunnen onderscheiden.

Als laatste onderzocht men de ACTN4 concentraties op longitudinale stalen van negen patiënten om de klaring van het virus te kunnen volgen over een verloop van tijd. Uit deze experimenten vond men dat patiënten met geklaarde virusinfectie een dalende ACTN4-concentratie hadden ten opzichte van vrouwen met een continue infectie waarbij het ACTN4-level constant bleef. Vrouwen met een persistente HPV-infectie vertoonden een accumulerende concentratie. Hoge levels van ACTN4 kunnen dus een indicatie zijn van een persisterende oncogene HPV-infectie en een verhoogde kans op de ontwikkeling van baarmoederhalskanker (Van Raemdonck et al., 2014).

De overige 133 unieke eiwitten gevonden bij vrouwen met precancereuze laesies werden aan verder onderzoek onderworpen door middel van *Ingenuity Pathway Analyse* (IPA-analyse) waarbij men de gevonden eiwitten ging screenen tegen gekende “*hallmarks of cancer pathways*”. Dit zijn pathways die betrokken zijn bij de volgende eigenschappen van tumoren: versnelde angiogenese, het ontwijken van apoptose, de continue inductie van groeifactoren, de ongevoeligheid voor groei inhibitoren, ongelimiteerde proliferatie, invasie en metastase, ongevoeligheid voor DNA schade en stress, metabole adaptatie, het ontwijken van het immuunsysteem en de tumor inflammatoire micro omgeving (Hanahan and Weinberg, 2011). Veel van deze eiwitten komen voor in een netwerk gecorreleerd met één van deze eigenschappen van een tumor. Men wilde onderlinge interacties tussen de eiwitten in een pathway, netwerk, of tussen de eiwitten en kanker aantonen. De onderlinge associatie werd ook weergegeven door middel van een p-waarde. Hoe kleiner de p-waarde, hoe kleiner de kans dat eiwitten een netwerk vormen puur gebaseerd op basis van kans. In totaal werden 75 pathways door IPA gedetecteerd. Bijna alle pathways werden beschreven zowel voor het CVV van de gezonde als dat van de precancereuze vrouwen. Toch gaf de IPA-test de meeste pathways een hogere betrouwbaarheidsscore (p-waarde 100x lager) bij de stalen van precancereuze patiënten. Hierbij kregen 18/75 pathways deze hoge score t.o.v. 7/75 pathways bij de stalen van ‘gezonde’ patiënten. De volgende stap in de analyse is de combinatie van deze betrouwbaarheidsscore én de betrokkenheid van het eiwit in één van de *hallmarks of cancer*. Ook hier was er een groot verschil in score tussen de stalen van gezonde en de precancereuze patiënten: 12/18 pathways met een hoge score hadden ook

een rol in één van de *hallmarks* (67%), dit was één uit de zeven eiwitten bij de gezonde CVV stalen (14%). Als laatste stap ging men kijken naar de eiwitten zelf in deze kankerpathways. Bij de stalen van 'gezonde' patiënten werden er 52 kankereiwitten gedetecteerd waarvan er vijf beschreven zijn in het proces van baarmoederhalskanker. Bij de stalen van precancereuze patiënten werden er 57 kankereiwitten gevonden die voorkwamen in één van de 75 pathways (Van Ostade et al., 2014). Van deze 57 eiwitten gevonden door IPA-analyse werden er vijf reeds beschreven als "kerneiwitten bij het proces van baarmoederhalskanker", onderzocht door Higareda et al in 2011. Deze onderzoeksgroep vergeleek zes kankercellijnen met elkaar: twee cellijnen die positief waren voor een HPV type 18 infectie (HeLa en CaLo-lijnen), twee cellijnen positief voor een HPV type 16 infectie (SiHa en CasKi) en twee HPV negatieve cellijnen (Vibo en C-33A). De controle gebeurde op een HaCaT-celijn, welke een spontaan gemuteerde (niet door HPV-infectie) onsterfelijke keratinocyt celijn is. Deze heeft een sterk replicatief potentieel omdat deze van epitheliale oorsprong is. Zo kon men een onderscheid maken tussen de biologische processen van transformatie of immortaliteit. Door gebruik te maken van deze experimentele setup kon men eiwitten identificeren die voorkomen in de neoplastische cellijnen zonder dat de aanwezigheid van intrinsieke variaties, zoals het virustype, hierbij een grote invloed op heeft. Op deze manier vond men 127 eiwitten die nu de centrale kern eiwitten van baarmoederhalskanker werden genoemd. Het zijn eiwitten die terug gevonden werden in alle zes kankercellijnen maar niet in de HaCaT-controlelijn of eiwitten die een significante (twee maal-) verandering in concentratie vertoonden (Higareda-Almaraz et al., 2011).

Verder werden er ook eiwitten geselecteerd uit de masterthesis van Lissa Van de Velde (2013). Hierin werd het volledige CVV-proteoom op longitudinale stalen geanalyseerd. Dit zijn minimaal drie CVV stalen die van éénzelfde persoon afkomstig zijn, maar gespreid in de tijd worden afgenomen. De opeenvolgende stalen werden afgenomen bij 15 vrouwen waarbij een afwijkend gynaecologisch onderzoek was vastgesteld. De vrouwen werden halfjaarlijks tot jaarlijks opgevolgd door middel van een colposcopie, waarbij telkens een lavage werd uitgevoerd die kan gebruikt worden voor proteoomanalyse. Via deze vorm van staalafname kan men een verband zoeken tussen de proteïne-identificatie enerzijds, en het al dan niet aanwezig zijn van een HPV-infectie, de graad van de HPV-infectie, het HPV-genotype, de cytologie van het weefsel en de latere klaring of persistentie van de infectie anderzijds. Door gebruik te maken van longitudinale stalen kon de inter-individuele variatie binnen de stalen uitgesloten worden. Van elk staal werd ook de virustiter door PCR bepaald (Van de Velde and Van Ostade, 2013).

6.1 Kandidaat Biomerkers

De volgende 12 eiwitten zullen geanalyseerd worden in het CVV van 29 stalen: zeven stalen van 'gezonde' patiënten, één staal van een 'gezonde' patiënt met additionele HIV-infectie, vier stalen van 'gezonde' patiënten met additionele HPV-infectie, acht LSIL-stalen, twee LSIL-stalen met HIV en zeven HSIL-stalen. Alfa-actinine-4 wordt zeker geanalyseerd omdat dit eiwit zeker in de assay zal worden opgenomen, mogelijk in combinatie met enkele van de onderstaande eiwitten. De eiwitten die dit jaar verder onderzocht worden, zijn gekozen op basis van de p-waarde die toen werd berekend (Van de Velde and Van Ostade, 2013). Het gaat hier over: Calcycline, Calgranuline B, Calpastatine, LDHA en PSME1. Verder wordt er gekozen voor eiwitten uit de Proteomes paper van Van Ostade et al. die betrokken zijn bij de "*central core of cancer*". Dit zijn de eiwitten: 14-3-3 proteïne epsilon, F-actine capping proteïne subunit alfa 2, Cathepsine B, Gelsoline en Macrofaag migratie inhibitie factor. Als laatste kwam Angiotensinogeen naar voor als eiwit dat mogelijk centraal ligt in een intracellulair interactie netwerk van 'kankereiwitten die in CVV worden teruggevonden (Van Ostade et al., 2014). In bijlage 1 wordt de literatuur beschreven voor deze 14 eiwitten met de betrokkenheid van elk eiwit bij gynaecologische kankers. De beschrijving van de detectie van het eiwit in het CVV wordt ook steeds vermeld in functie van het voorgaand onderzoek van het labo (tabel 2).

Tabel 2. De biomerkers in deze masterthesis, gebaseerd op hun selectiecriteria.

Eiwit	Selectiecriteria	Referentie
Alfa-actinine-4 (ACTN4)	Aanwezig in alle precancereuze stalen maar niet in gezonde	(Van Raemdonck et al., 2014)
Angiotensinogeen	Centrale rol in intracellulair interactienetwerk van kankereiwitten	(Van Ostade et al., 2014)
14-3-3 proteïne epsilon	Betrokken in de “centrale kern van baarmoederhalskankereiwitten”	(Higareda-Almaraz et al., 2011)
Calcycline (S100A6)	p-waarde: 0,016	(Van de Velde and Van Ostade, 2013)
Calgranuline B (S100A9)	p-waarde: 0,023	(Van de Velde and Van Ostade, 2013)
Calpastatine (ICAL)	p-waarde: 0,025	(Van de Velde and Van Ostade, 2013)
Cathepsine B	Betrokken in de “centrale kern van baarmoederhalskankereiwitten”	(Higareda-Almaraz et al., 2011)
F-actine capping proteïne subunit alfa-2 (Capza2)	Betrokken in de “centrale kern van baarmoederhalskankereiwitten”	(Higareda-Almaraz et al., 2011)
Gelsoline (GSN)	Betrokken in de “centrale kern van baarmoederhalskankereiwitten”	(Higareda-Almaraz et al., 2011)
Lactaat dehydrogenase A (LDHA)	p-waarde: 0,017	(Van de Velde and Van Ostade, 2013)
Macrofaag migratie inhibitie factor (MIF)	Betrokken in de “centrale kern van baarmoederhalskankereiwitten” en p-waarde 0,01	(Higareda-Almaraz et al., 2011); (Van de Velde and Van Ostade, 2013)
PSME1	p-waarde: 0,001	(Van de Velde and Van Ostade, 2013)

7 Massaspectrometrie

Massaspectrometrie is een analytische techniek die zowel kwalitatieve (structurele) als kwantitatieve (concentratie) informatie kan verschaffen over moleculen na hun conversie tot ionen. Bij proteoomanalyse zijn er twee conversiemethoden die het meest gebruikt worden: de ESI- of de MALDI ionisatiebron (Aebersold and Mann, 2003). Bij de ESI-ionisatie zullen de moleculen doorheen de ionisatiebron gestuurd worden, in dit geval een elektropray, waarbij ze meestal één-, twee- of driewaardig positief of negatief geladen kunnen worden. De peptiden in oplossing zullen geladen worden en naar de gasfase getransfereerd worden. Dit proces gebeurt in drie grote stappen: er wordt een fijne spray van geladen druppels gevormd door het solvent door een silica capillair waarop een spanning van 2kV staat te sturen. De geladen druppels die gevormd werden aan het einde van de elektropray tip, zullen nu doorheen een elektromagnetisch veld gestuurd worden. De geladen druppels worden door dit veld richting analysator afgebogen terwijl ongeladen druppels op deze manier weg gefilterd worden. De tweede stap is het verdampen van het solvent in de druppels. Dit gebeurt door een stijging van de temperatuur aan de conetip, afhankelijk van de flow en door middel van een stroom van stikstofgas. De druppels zullen dus kleiner worden door het verdampen van het solvent, hierdoor zal de dichtheid van de oppervlakte ladingen stijgen, terwijl de diameter van de druppel steeds kleiner wordt. Uiteindelijk zal het elektrisch veld in de geladen druppel een kritisch punt bereiken waarbij het kinetisch en energetisch voordeling is voor de ionen aan de oppervlakte van de druppel om over te gaan naar de gasfase. Dit is de laatste stap in het ionisatieproces met een ESI-bron (Ho et al., 2003). Het ioniseren van peptiden in de vloeistof vereist dat de vloeistof aan een constante flow door de ESI-bron vloeit. Dit maakt de ESI-bron uitermate geschikt om vloeistofchromatografie rechtstreeks aan massaspectrometrie te koppelen (LC-MS) (Bodnar et al., 2003). *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* (MALDI) is de andere methode om de peptiden te ioniseren. De MALDI-bron bestaat uit een vacuümkamer met een laser. De gekozen matrix is afhankelijk van de aard van het

staal, maar voor peptiden gebruikt men vaak *alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid*. De peptiden zijn voornamelijk eenwaardig geladen en kunnen met behulp van elektromagnetische velden de massaspectrometer in worden geleid (Wang et al., 2016).

Detectie van de peptiden gebeurt op basis van hun massa-lading verhouding (m/z -waarde). In de afgelopen decennia zijn verschillende detectoren ontwikkeld. De meest gebruikte detector is de fotomultiplier tube (PMT) waarbij de ionen op een aluminium plaatje zullen botsen waardoor secundaire elektronen zullen vrijkomen. Deze elektronenstroom wordt nu versterkt in een elektron multiplier, waardoor deze uiteindelijk voor een detecteerbaar signaal zorgt (van Dam et al., 2012). Als massa-analysator wordt in dit onderzoek meestal een quadropool gebruikt. Dit is een structuur opgebouwd uit vier geleidende cilinders waartussen een bepaald elektromagnetisch veld opgewekt kan worden. De ionen met de juiste m/z -verhouding zullen langs de lengteas, tussen de vier cilinders migreren in een spiraalvormige vlucht richting de detectorplaat. Als de m/z -waarde van de ionen niet overeenstemt met het opgebouwde elektromagnetisch veld, dan worden de ionen niet in vlucht gehouden en eindigen zij tegen de wand van de massaspectrometer. Door te wisselen van opgebouwd elektromagnetisch veld op de quadropool, kan men ionen met een andere m/z -waarde selecteren en doorlaten naar de detectorplaat (Fenn et al., 1989). Soms kan er ook een hexapool aanwezig zijn met 6 cilinders om een elektromagnetisch veld mee op te wekken en de ionen terug te concentreren of centreren (Douglas et al., 2005).

8 Multiple reactie monitoring (MRM)

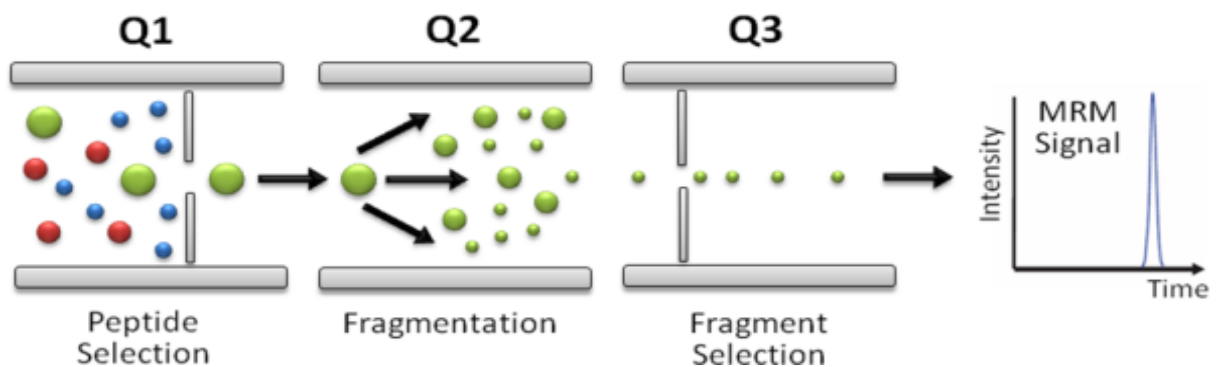
De MRM massaspectrometrische techniek gebruikt drie quadropolen (TripleQ; QqQ) na elkaar en volgt op een ESI-spray stap waarbij het solvent zal verdampen en er ionisatie zal optreden. In de eerste quadropool zal er geselecteerd worden op een bepaald, geïoniseerd, precursorpeptide dat in de collisioneel (q_2) gefragmenteerd zal worden. In de derde quadropool (Q_3) zal er selectie optreden van een fragment van dit peptide (Figuur 3). MRM kan tot honderd maal gevoeliger zijn voor bepaalde peptiden in vergelijking met traditionele MS-methoden. Het kan proteïnen in klinische stalen (zoals plasma) detecteren in een lage ng/ml concentratie (Keshishian et al., 2007). Bij MRM ligt de focus op de detectie van meerdere proteotypische peptiden voor een bepaald eiwit. Een eiwit zal na trypsine digest voor enkele tientallen tot honderden peptiden zorgen. Toch is het niet voordelig of mogelijk om al deze peptiden te gaan detecteren via massaspectrometrie. Daarom is er nood aan een panel van peptiden die detecteerbaar, consistent aanwezig en uniek zijn voor het eiwit. Deze peptiden noemt men proteotypische peptiden (PTPs). PTPs hebben meestal een AZ-sequentie tussen 15-25 AZ waarvan de sequentie eiwit-specifiek is en kunnen dus gebruikt worden bij de detectie van het gezochte eiwit in het staal. Er zijn nog meerdere eigenschappen waaraan ze moeten voldoen (tabel 3) (Craig et al., 2005). Het selectieproces om een proteotypisch peptide te selecteren voor een bepaald eiwit zal beschreven worden bij de resultaten, gebruikmakend van de programma's MRMAid, ESP Predictor en BLAST. Na de identificatie van enkele proteotypische peptiden van een eiwit kan met behulp van een UPLC-tripel quadropool massaspectrometer gezocht worden naar deze PTP in een cervicovaginaal staal. MRM-MS sensitiviteit is sterk afhankelijk van de instellingen van het instrument, zoals collisioneel-energie en capillair voltage, omdat dezen de intensiteit van product-ion signalen sterk beïnvloeden. Deze parameters dienen daarom geoptimaliseerd te worden voor elk PTP. Per eiwit worden er multiple PTPs geselecteerd (minstens 2) en multiple transitie van dit proteotypisch peptide (minstens 5). Het precursor ion en één van zijn product ionen noemt men gezamenlijk een transitie. Deze proteotypische peptiden kunnen dan commercieel nagemaakt worden, waarbij men dan spreekt over een synthetisch peptide. Dit heeft dezelfde aminozuursequentie als het endogeen peptide, maar wordt in zijn productie verzaamd met ^{15}N en ^{13}C isotopen op zelf gekozen posities in één of meerdere aminozuren. Deze isotopisch gelabelde peptiden hebben echter dezelfde fysicochemische eigenschappen als het endogeen peptide, waardoor ze dezelfde elutietijd hebben bij vloeistofchromatografie.

Peptiden die representatief zijn voor de gezochte endogene eiwitten in het staal kunnen dan gekwantificeerd worden door het staal te spiken met een gekende hoeveelheid van het synthetisch PTP. De massaspectrometer kan het synthetisch peptide herkennen aan het verschil in moleculair gewicht. Omdat men exact weet hoeveel synthetisch peptide men heeft toegevoegd aan het staal kan men door middel van de verhouding tussen endogeen en verzwaard peptide achterhalen in welke concentratie het endogeen peptide aanwezig was in het staal (Pan et al., 2009).

Tabel 3. Eigenschappen van proteotypische peptiden. Selectie naar Craig et al., 2005.

Eigenschappen van proteotypische peptiden nodig voor optimale detectie:
Herhaaldelijke en consistente observeerbaarheid
Representatieve AZ-sequentie voor het eiwit
Peptiden met Methionine of Cysteïne bevatten best vermijden
Ontstaan na gecontroleerde klieving met trypsine
Partiële knipping vermijden
Scheiding via HPLC moet mogelijk zijn
Extractie uit gels moet mogelijk zijn
Zachte en goede ESI-ionisatie moet mogelijk zijn
Detectie en identificatie d.m.v massaspectrometer is noodzakelijk

In vergelijking met ELISA heeft MRM als voordeel dat het een multiplex reactie toelaat. Bij zulke multiplex reactie kunnen er twee tot drie proteotypische peptiden worden gedetecteerd per eiwit en kunnen wel 40 verschillende eiwitten, en dus ongeveer 120 proteotypische peptiden geanalyseerd worden per analyse. Dit bespaart analysetijd en reagentia, maar laat eveneens toe dat er ondanks een kleine hoeveelheid staal toch op meerdere eiwitten gescreend wordt. Hierbij dient de elutietijd van de peptiden op de C18-kolom van het UPLC-systeem van het Xevo toestel (Waters) wel op voorhand gekend te zijn zodat Q1 voor enkele seconden kan worden ingesteld om het juiste peptide te kunnen detecteren. MRM noodzaakt geen antilichaam voor detectie van het eiwit, wat wel het geval is bij ELISA.

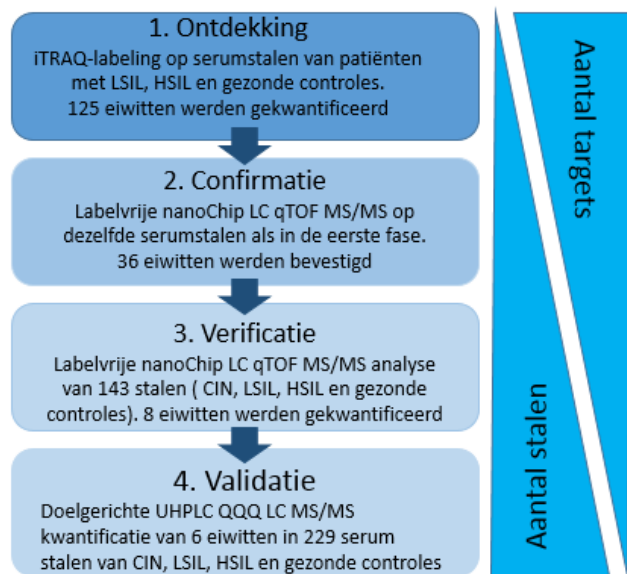


Figuur 3. Verschillende stappen tijdens MRM. De eerste quadrupool (Q1) selecteert een proteotypisch peptide met een bepaalde m/z -ratio. Dit peptide komt terecht in de collisioneel (Q2) waarin het peptide fragmenteert. Tenslotte selecteert de derde quadrupool(Q3) één specifiek fragment van dat peptide (Valkenburg N. and Van Ostade X., 2014a).

8.1 MRM-studies

Er zijn al vele studies uitgevoerd die multiplex reactie monitoring (MRM) gebruiken in hun onderzoek naar kandidaat biomerkers voor verschillende vormen van kanker. Er is al één studie gebeurd door Boichenko et al. in 2014 die werkt met biomerkers voor baarmoederhalskanker. Echter, deze waren opgezuiverd uit het plasma, in plaats van uit het cervicovaginaal vocht. Deze onderzoeksgroep heeft een op massaspectrometrie gebaseerde pipeline opgestart die stabiele isotoop labeling combineerde met labeling vrije technieken op meer dan 400 serumstalen. De serumstalen werden eerst ontzout door middel van *reversed-phase* chromatografie om vervolgens de hoog abundante eiwitten er uit te kunnen filteren gebruikmakend van

multiple affiniteitschromatografie. De volgende eiwitten werden er gedeeltelijk uitgefilterd door de aanwezigheid van de geïmmobiliseerde antilichamen op de kolom: serumalbumine, immunoglobulines G, A en A1AT, Serotransferrine (TRFE) en Haptoglobine (HPT). Stalen werden getrypsiniseerd en gelabeld met iTRAQ-labels (isobare tags voor relatieve en absolute kwantificatie). De ITRAQ methode is gebaseerd op de covalente labeling van de N-terminus van peptiden, afkomstig van eiwitdigestie, met tags van verschillende massa. Stalen worden dan gepoold en gefractioneerd door vloeistofchromatografie en geanalyseerd met tandem massaspectrometrie (MS/MS). Dan wordt er een database search uitgevoerd waarbij men de fragmentatie data gebruikt om de gelabelde peptiden te identificeren om zo de corresponderende eiwitten te bekomen. In deze studie werden de iTRAQ-gelabelde peptiden eerst van elkaar gescheiden door strong kation exchange om de complexiteit van het mengsel te verminderen. Door middel van deze aanpak heeft deze groep een panel kunnen samenstellen van zes eiwitten met een sensitiviteit van 67% en een specificiteit van 88%. De zes gevonden eiwitten zijn Alfa-1-antitrypsine, Alfa-1-acid-glycoproteïne, Haptoglobine, Serotransferrine, Vitamine D-binding proteïne, Alfa-2-HS-glycoproteïne (Boichenko et al., 2014). De studieopzet staat beschreven in figuur 4.



Figuur 4. Studieopzet van het MRM-onderzoek. Naar Boickenko et al ,2014

Objectieven projectvoorstel

Door de hoge prevalentie van HPV in de populatie kunnen vrouwen zich laten screenen voor het virus, toch blijft de nood voor betere screeningsmethoden voor baarmoederhalskanker, omwille van veel vals negatieve resultaten, hoog. In deze masterproef wordt getracht om biomerkers te identificeren die een onderscheid kunnen maken tussen stalen van gezonde- en precancereuze (LSIL of HSIL) patiënten. In voorgaand onderzoek van het labo kwam ACTN4 naar voor als biomerker die hiervoor geschikt is, maar die op zichzelf een sensitiviteit en specificiteit heeft van 86%. Dit is niet voldoende om een diagnostische test te kunnen opstellen. Er zijn echter nog meer eiwitten aanwezig in het cervicovaginaal vocht (CVV) die de rol van biomerker voor cervixkanker kunnen opnemen. De biomerkers worden geanalyseerd uit cervicovaginale lavages (vaglav's) verkregen na colposcopie. Aangezien vaglav's op een eenvoudige, niet-invasieve manier gecollecteerd kunnen worden, vormt dit lichaamsvocht een goede bron voor biomerkers gerelateerd aan pathologieën van de vrouwelijke genitale tractus. Er wordt tijdens deze masterthesis dan ook gestreefd om de sensitiviteit en specificiteit van deze kandidaat biomerkers na te gaan zodat er uiteindelijk mogelijke combinaties gevormd kunnen worden met ACTN4 waardoor de gecombineerde sensitiviteit en specificiteit zal stijgen. Screening van het CVV op de aanwezige concentratie ACTN4 gebeurt via ELISA, de andere potentiële biomerkers worden getest door middel van MRM (Multiple reactie monitoring) De CVV stalen die gebruikt zullen worden in het onderzoek zijn afkomstig van gezonde- en HPV of HIV geïnfecteerde vrouwen. Ook het CVV van vrouwen die al in een bepaald (voor)stadium van baarmoederhalskanker zitten, wordt opgenomen in de studie. Er zullen 29 stalen geanalyseerd worden: zeven stalen van 'gezonde' patiënten, één staal van 'gezonde' patiënt met additionele HIV-infectie, vier stalen van 'gezonde' patiënten met additionele HPV-infectie, acht LSIL-stalen, twee LSIL-stalen met HIV en zeven HSIL-stalen. Alle stalen zijn afkomstig van het Universitair Ziekenhuis Antwerpen (UZA). De stalen met additionele HIV-infectie worden getest om te kijken of deze een invloed hebben op de sensitiviteit en specificiteit van de kandidaat biomerkers voor het onderscheid tussen gezonde en precancereuze patiënten. De resultaten zullen worden verzameld voor verdere statistische analyse zoals het opstellen van ROC-curves (Receiver operating characteristics) om de discriminatiedrempel (waarde die discrimineert tussen precancereus en gezond) te bepalen omdat deze toont hoe de sensitiviteit en specificiteit verandert als de discriminatiedrempel varieert. De sensitiviteit in functie van de specificiteit (1-specificiteit) worden op de assen uitgezet. Uit deze data zal men dan de bijdrage van de combinatie van biomerkers bepalen die het meest sensitief en specifiek zijn en de accuraatheid doen verhogen. Een ROC-curve analyse kan dus beschouwd worden als de standaard methode om de prestatie van een test te beoordelen (Xia et al., 2013).

Materiaal en methoden

1 Algemeen protocol

De stalen worden behandeld volgens een gestandaardiseerd protocol van het labo dat doorheen de jaren is geoptimaliseerd. Alle stappen werden uitgevoerd op ijs of onder gekoelde omstandigheden om eiwitdegradatie te voorkomen.

2 Oorsprong stalen

Stalen voor dit onderzoek zijn afkomstig van cervicovaginale lavages ten gevolge van colposcopie. Deze techniek werd uitgelegd in de inleiding bij het onderdeel 'screening'. Er zullen 29 stalen geanalyseerd worden: zeven stalen van 'gezonde' patiënten, één staal van 'gezonde' patiënten met additionele HIV-infectie, vier stalen van 'gezonde' patiënten met additionele HPV-infectie, acht LSIL-stalen, twee LSIL-stalen met additionele HIV-infectie en zeven HSIL-stalen. Alle stalen zijn afkomstig van het Universitair Ziekenhuis Antwerpen (UZA), waarbij men bij elke op te volgen patiënt een uitstrijkje en een colposcopisch onderzoek uitvoerde. Deze stalen werden verkregen via Prof. Dr. Wiebren Tjalma, hoofd op de dienst gynaecologische oncologie van het UZA. De stalen werden verder doorgestuurd naar het Algemeen Medisch Laboratorium Antwerpen (AML) voor genotypering van het virus, en voor een liquid based cytologietest, uitgevoerd via de ThinPrep 2000 methode.

3 Centrifugatie van UZA-stalen

De stalen werden ontdooid uit de -80°C vriezer en van elk staal werd minstens tien ml meegenomen voor verdere analyse. Indien later bij de eiwitconcentratiebepaling blijkt dat de concentratie aan eiwitten te laag ligt, wordt er nog eens tot 20ml extra van hetzelfde staal gecentrifugeerd. De stalen worden gecentrifugeerd in de Sorvall RC500S Plus centrifuge op 10000g gedurende 150 minuten met een *fixed angle* rotor om mucus en celdebris af te precipiteren. De pellet bevat het celdebris en wordt niet bewaard. Het supernatans bevat de proteïnen en wordt overgebracht in polypropyleen tubes van 5 ml om nadien weer ingevroren te worden.

4 Indampen

Het proces van indampen gaat makkelijker als de stalen nog bevroren zijn. Indamping gebeurt door middel van een Savant SpeedVac SC-100 om het volume te verkleinen en de proteïnen te concentreren. Dit gebeurt onder vacuüm om het proces van verdamping te vergemakkelijken en versnellen. Door de drukverlaging als gevolg van het geïnduceerde vacuüm, daalt het kookpunt naar een temperatuur van 50-60°C. Het verdampte solvent wordt in de Savant Cooltrap RVT400 opgeslagen om de motor niet te contamineren. De stalen worden ingedampd tot er een volume van ongeveer 2 ml overblijft. Dan wordt er een concentratiebepaling via RP-C4-HPLC uitgevoerd (zie verder). Indien de eiwitconcentratie lager ligt dan 1000µg/ml en het volume nog groot genoeg is (ongeveer 2ml) wordt het staal verder ingedampd. Deze stap is ook belangrijk voor de acetonprecipitatie want hierbij moet de gewenste hoeveelheid eiwitten in een voldoende klein volume zitten.

5 RP-C4 chromatografie: eiwitconcentratiebepaling

Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is een methode waarmee moleculen op basis van hydrofobiciteit gescheiden worden. De scheiding van proteïnen of peptiden vindt plaats op een kolom met poreuze korrels als stationaire fase. Een RP-C4 kolom bevat korrels met hydrofobe ketens met een lengte van vier koolstofatomen en een RP-C18 kolom heeft korrels met ketens van 18 koolstofatomen. Door die langere ketens is een RP-C18 kolom meer hydrofoob ten opzichte van een RP-C4 kolom. Proteïnen zijn groter dan peptiden en bevatten meerdere hydrofobe aminozuren, waardoor een RP-C4 kolom volstaat om proteïnen vast te houden op de kolom. Voor peptiden is een RP-C18 nodig die meer hydrofobe interactie biedt om de peptiden tijdelijk te binden. De mobiele fase in RP-HPLC is een verhouding van water en Acetonitrile (Biosolve), met een organisch zuur zoals Trifluorazijnzuur (TFA) (Biosolve) als ion pairing reagent. Een ion pairing reagent heeft een

polaire kop en een hydrofobe staart waarmee het een brug kan vormen tussen de polaire aminozuren die aanwezig zijn in de peptiden en eiwitten en de hydrofobe stationaire fase. Zo blijven meer polaire proteïnen en peptiden beter op de kolom gebonden waardoor ze trager zullen elueren. Bepaling van de eiwitconcentratie per staal kan nauwkeurig uitgevoerd worden door het staal te testen op een RP-C4 kolom op het Alliance HPLC e2695-toestel. De kolom die wordt gebruikt is de Grace-Alliance VYDAC214TP5415 C4 met een korrelgrootte van 5µm, een lengte van 150mm en een diameter van 4,6mm. Een analyse duurt 30 minuten en wordt bij 37°C uitgevoerd op het Waters Alliance HPLC-toestel. De temperatuur wordt opgebouwd in de kolomoven van het toestel. De gradiënt die wordt toegepast is terug te vinden in tabel 4 en is opgebouwd met LC-MS water (Biosolve) +0,1% Trifluorazijnzuur (TFA) en Acetonitrile (ACN) + 0,1% TFA. Detectie gebeurt door de absorptie te meten bij 214nm en 280nm. Proteïnen worden op basis van de absorptie door aromatische groepen gedetecteerd bij 280nm, terwijl peptiden bij 214nm worden gedetecteerd op basis van de absorptie door de aanwezige peptidebindingen. Er is vooraf ook een ijking van de kolom uitgevoerd door het testen van een proteïnestandaard (Sigma HPLC Protein Standard Mixture) in verschillende, gekende concentraties. Van deze standaard werd dan een calibratiecurve in Excel opgesteld met de hoeveelheid (µg) proteïnen standaard op de X-as en de oppervlakte bij 214nm op de Y-as. Bij elke proteïnescheiding wordt door integratie via de software de “*area/absorption under the curve (AUC)*” van het chromatogram bepaald en dan ingevuld in de vergelijking bekomen uit de calibratiecurve van de proteïnen standaard. Deze techniek wordt steeds toegepast op 50-200µl van de stalen afkomstig van het UZA.

Tabel 4. De gelopen gradiënt bij HPLC C4 eiwitconcentratiebepaling. Solvent A: LC-MS H₂O +0,1% TFA. Solvent B: Acetonitril + 0,1% TFA. TFA: Trifluorazijnzuur.

	t (min)	% A	% B	Flow (ml)	Temp (°C)
1	0	97	3	1	37
2	2	97	3	1	37
3	7	85	15	1	37
4	22	40	60	1	37
5	23	0	100	1	37
6	27	0	100	1	37
7	30	97	3	1	37

6 Acetonprecipitatie

Alvorens stalen te trypsiniseren, worden ze geconcentreerd en opgezuiverd door middel van acetonprecipitatie. Aceton (Biosolve) is een organisch solvent dat proteïnen doet aggregeren en neerslaan ten gevolge van hun hydrofobe interacties terwijl de interfererende substanties in oplossing blijven (Santa et al., 2016). Er dient rekening gehouden te worden met het feit dat tijdens de acetonprecipitatie van dit type stalen 20% van het staal verloren gaat (bevindingen gebaseerd op voorgaande experimenten). Daarom zal met 200µg aan eiwit gestart worden om na precipitatie 160µg over te houden. Acetonprecipitatie gebeurt in twee ml eppendorf tubes met zes maal het volume aan koude aceton (-20°C) ten opzichte van het volume staal. De neerslagreactie gebeurt overnacht. Nadien zal er dan een tweede centrifugatiestap optreden van 14000 rpm voor 20 minuten bij een temperatuur van 4°C. De aceton kan nu makkelijk verwijderd worden en de eiwitpellet kan geresuspendeerd worden in de correcte hoeveelheid 50nM Tris-HCl buffer met pH 8,7, afhankelijk van de eiwitconcentratie in het staal. De buffer bevat ook 6M ureum, 5mM DTT en 10% β-Mercaptoethanol (β-ME). De theoretische verhouding van de buffers en componenten om 160µg eiwit te kunnen trypsiniseren wordt weergegeven in tabel 5.

Tabel 5. Verhouding buffers trypsinisatie. Hoeveelheid buffercomponenten nodig om 160µg eiwit te kunnen trypsiniseren. Als er meer eiwit getrypsiniseerd moet worden, worden deze hoeveelheden aangepast.

Buffers	Volumes
50mM Tris/6M ureum/5mM DTT/10% Beta-ME	40µl
50mM Tris/1mM CaCl ₂	120µl
200mM iodoacetamide	16µl
Trypsine-oplossing in 10mM HCl	10,7µl
Concentratie trypsin:eiwit/trypsin verhouding	30µg/0,5µl

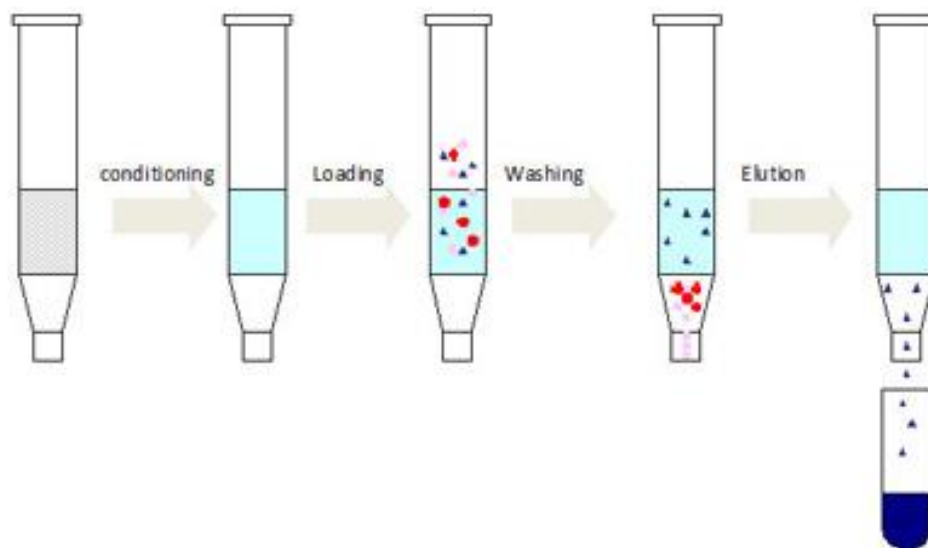
7 Trypsinisatie

Er zal een enzymatische klieving met het protease trypsin worden uitgevoerd om de eiwitten te knippen tot peptiden. Trypsine (Promega) wordt gebruikt omdat het een welbepaalde specificiteit heeft: het hydrolyseert enkel de peptidebindingen waarbij de carbonylgroep wordt gevolgd door arginine (Arg) of lysine (Lys) en zal zo voor fragmenten zorgen die binnen de range vallen voor detectie met LC-MS. Voor een optimale trypsinisatiestap moeten eiwitten in gedenatureerde toestand zijn, daarom wordt 6M ureum (Gibco BRL) toegevoegd, een chaotroop agentia. Denaturatie gebeurt door verhitting van de stalen in een warm waterbad van 65°C voor 1 uur. Disulfidebruggen tussen twee cysteïnes zullen verbroken worden door 5mM dithiothreitol (DTT) (Sigma) en 10% β-ME (Sigma) aan de buffer toe te voegen (Tihonov et al., 2016). Na het verhittingsproces worden de stalen verdund met de correcte hoeveelheid van de 50mM Tris HCl pH8.7/ 1mM CaCl₂ buffer. Deze buffer bevat CaCl₂ (Merck) dat twee belangrijke functies bezit. Enerzijds zal het trypsin gaan activeren door te binden aan de Calcium-bindingloop in trypsin, anderzijds zal het de vorige buffer met 6M ureum, gaan verdunnen omdat trypsin anders zelf gedenatureerd wordt door de overmaat aan ureum. De Tris HCl/ 1mM CaCl₂ buffer wordt in drievoud toegevoegd ten opzichte van de ureumbuffer. Tris (Sigma) zal ervoor zorgen dat de pH van de buffer constant blijft na toevoeging van HCl (2mol/l) (Merck) om de oplossing op pH te stellen. Vervolgens wordt een iodoacetamidebuffer toegevoegd. Iodoacetamide is een alkylender agentia dat de cysteïnegroepen zal modificeren door covalent te binden met hun thiolgroep, op deze manier zal de vorming van disulfidebruggen irreversibel worden geïnhibeerd. Deze reactiestap duurt één uur en wordt op kamertemperatuur in een donkere ruimte uitgevoerd omdat iodoacetamide (Sigma) lichtgevoelig is (Kolsrud Hustoft H. et al., 2012). Als laatste stap volgt de trypsinisatie zelf. Er wordt met een verhouding van 30µg eiwit/0,5µl commercieel gemodificeerd trypsin gewerkt. De Trypsinedigest wordt uitgevoerd bij het pH optimum van 8.7 in het warm waterbad op 37°C voor 18 uur. Het proces stoppen gebeurt door de stalen in te vriezen op -20°C.

8 Solid Phase extractie

Na het trypsinisatie proces zitten stoffen zoals ureum en Tris nog steeds vermengd met het staal, maar deze kunnen interfereren bij verdere analysetechnieken. Om deze stoffen zoveel mogelijk te verwijderen wordt gebruik gemaakt van *solid phase* extractie (SPE) (Hecht et al., 2016). Hiervoor werden de meest voorkomende protocols getest en vergeleken (tabel 6). Om te bepalen welk van de vijf protocols het best is om te ontzouten via SPE maar ook het grootste eiwitrendement oplevert werd een experiment opgezet met een eiwitstandaard van Sigma die vier eiwitten bevat, namelijk: Ribonuclease A, Cytochroom c, Holo-transferrine en Apomyoglobine. Het experiment werd in triplo uitgevoerd waarbij elk protocol terzelfdertijd drie maal werd doorlopen met deze standaard die vooraf getrypsiniseerd werd. Per protocol werd 200µg digest geladen. Door elk protocol tezamen drie maal te doorlopen werden grote variaties in de doorlooptijd vermeden en werd de reproduceerbaarheid van elke methode nagegaan. Deze doorlooptijd moest ook hoog genoeg liggen om niet alleen chemische-, maar ook fysische binding van de peptiden aan de kolompakking te waarborgen. Deze experimenten werden in 2014 door Nick Valkenburg (Valkenburg N. and Van Ostade X., 2014a) reeds

uitgevoerd op Varian Bond Elut C18 kolommen van Agilent maar omdat deze veranderd werden door GracePure™ SPE C18-Max 50mg/1ml kolommen werden alle protocols nu opnieuw herhaald. De C18-packing in de kolom zal nu selectief peptiden kunnen binden terwijl de contaminanten zo verwijderd worden. De kolom moest eerst geconditioneerd en geëquilibreerd worden zodat de bindingsplaatsen voor de peptiden geactiveerd worden en beschikbaar zijn op de korrelpacking. Dan werd het staal geladen op de kolom, maar zal ook een *follow-through* uitgevoerd worden om er zeker van te zijn dat alle peptiden konden binden aan de kolom. Vervolgens werd een wasstap uitgevoerd om alle contaminanten te verwijderen waarna de peptiden geëluëerd en opgevangen werden (figuur 5). De extractie van deze peptiden uit de kolom werd mogelijk gemaakt omdat er in het systeem een vacuüm is opgebouwd. Het eluaat werd geïnjecteerd op een Vydac RP-HPLC C18 kolom (5 µm, 250 x 4.6 mm, Grace) gekoppeld aan een HPLC-systeem (Alliance e2695, Waters) om de peptiden van elkaar te kunnen scheiden en de concentratie te kunnen bepalen. Elutie volgde door spoeling van de kolom met een gradiënt met een stijgende concentratie ACN waarbij peptiden werden gedetecteerd met behulp van een PDA (photodiode array detector 996, Waters) terwijl simultaan de absorptie werd gemeten van ultraviolet licht bij 214 nm en 280 nm.



Figuur 5. Een schematische voorstelling van *solid phase extractie*. Bij de niet getoonde *follow-through* stap wordt het staal nog een keer opnieuw doorheen de kolom geladen om er zeker van te zijn dat alle peptiden aan de kolom kunnen binden. Figuur naar Nick Valkenborg (Valkenborg N. and Van Ostade X., 2014a).

Tabel 6. De vijf geteste protocols voor solid phase extractie. Van elke buffer werd 10ml aangemaakt. ACN: Acetonitril. FA: Formic Acid. De procedures zijn overgenomen van Nick Valkenburg (Valkenburg N. and Van Ostade X., 2014a).

	Protocol A (Azijnzuur)	Protocol B (Methanol)	Protocol C (ACN-H₂O)	Protocol D (Isopropanol)	Protocol E (80% ACN)
Conditioneren	95% ACN + 5% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 3x	100% Methanol (Biosolve) 100µl 3x	50% ACN + 50% LC-MS H ₂ O + 0,1%FA (Biosolve) 100µl 3x	50% ACN + 50% LC-MS H ₂ O + 0,1%FA 100µl 3x	80% ACN + 20% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 3x
Equilibreren	0,5% Azijnzuur + 0,1%FA 100µl 2x	100% LC-MS H ₂ O 100µl 2x	100% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 2x	100% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 2x	95% LC-MS H ₂ O + 5% ACN + 0,1% FA 100µl 2x
Laden	Staal + 0,1% FA <i>Follow-through</i> doorheen SPE	Staal <i>Follow-through</i> doorheen SPE	Staal + 0,1% FA <i>Follow-through</i> doorheen SPE	Staal + 0,1% FA <i>Follow-through</i> doorheen SPE	Staal + 0,1% FA <i>Follow-through</i> doorheen SPE
Wassen	99,5% LC-MS H ₂ O + 0,5% Azijnzuur + 0,1% FA 100µl 2x	80% LC-MS H ₂ O + 20% Methanol 100µl 2x	100% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 2x	100% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 2x	95% LC-MS H ₂ O + 5% ACN +0,1% FA 100µl 2x
Elueren	95% ACN + 5% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 3x	40% Methanol + 40% ACN + 20% 0,1% HCl 100µl 3x	50% ACN + 50% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 3x	25% ACN + 10% Isopropanol (Biosolve) + 65% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 3x	80% ACN + 20% LC-MS H ₂ O + 0,1% FA 100µl 3x

9 Reversed phase C18 high performance liquid chromatography (RP-C18 HPLC)

Met een 95% water – 5% acetonitril verhouding wordt de kolom geconditioneerd en komen sterk polaire moleculen eerst van de kolom. De hydrofobe peptiden binden wel aan de stationaire fase van de kolom en elueren pas wanneer de opgebouwde gradiënt geleidelijk naar een 40-60 verhouding gebracht wordt. Door de verhouding gestaag te veranderen zullen minder hydrofobe peptiden eerst elueren en meer hydrofobe later. Om enige resterende peptiden van de kolom te spoelen stijgt de gradiënt naar 100% acetonitril. RP-C18-HPLC wordt meestal gekoppeld aan een massaspectrometrisch toestel. De gradiënt is terug te vinden in tabel 7 en werd gelopen om de opbrengst van de verschillende SPE-procedures te bepalen.

Tabel 7. De gelopen gradiënt bij HPLC C18 eiwitconcentratiebepaling bij SPE. SPE: *solid phase extractie*. Solvent A: LC-MS H₂O +0,1% TFA. Solvent B: Acetonitril (ACN) + 0,1% TFA. TFA: Trifluorazijnzuur.

	t (min)	% A	% B	Flow (ml)	Temp (°C)
1	0	95	5	1	37
2	2	95	5	1	37
3	25	40	60	1	37
4	30	0	100	1	37
5	32	0	100	1	37
6	34	95	5	1	37
7	35	95	5	1	37

10 Keuze proteotypische peptiden

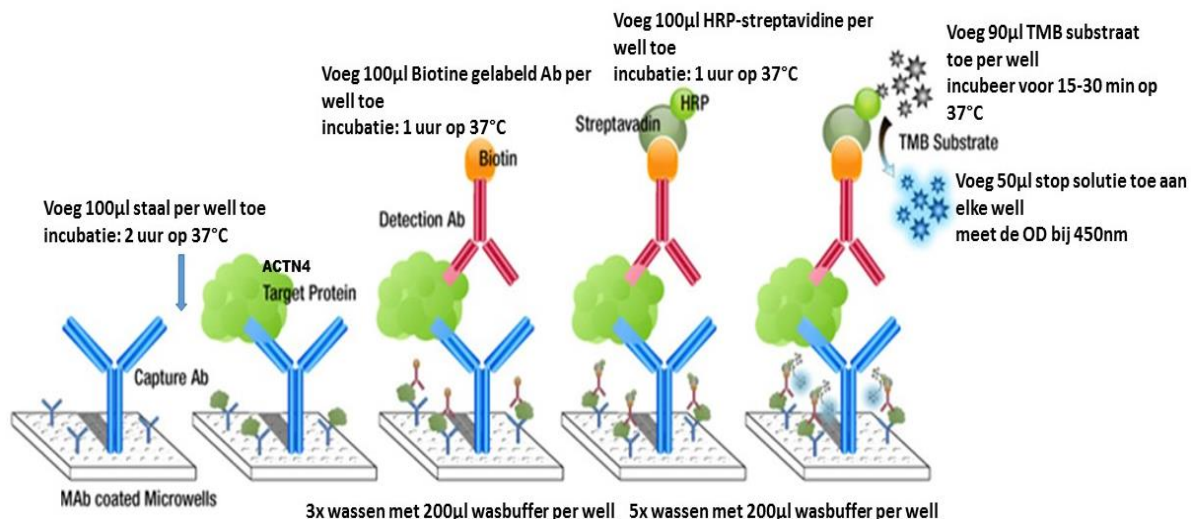
Selectie van de proteotypische peptiden is de eerste en meest cruciale stap wanneer men proteïnen wil kwantificeren door middel van MRM (Sherman et al., 2009). In een eerste stap wordt een voorspelling gemaakt van kandidaat proteotypische peptiden door computermodellen. Met het ESP Predictor (*enhanced signature peptide*) programma van Broad Institute tracht men op basis van 550 fysico-chemische eigenschappen waaronder ionisatiegraad, aantal AZ, massa, lading,... zogenaamde *high-respondering peptides* van een bepaald eiwit te voorspellen. Dit zijn peptiden waarvan verwacht wordt dat ze het hoogste signaal opwekken in ESI-MS-analyse waardoor ze gevoeliger gedetecteerd kunnen worden (Fusaro et al., 2009). Andere eigenschappen van een goed PTP zijn terug te vinden in tabel 3. De dataset wordt geanalyseerd met behulp van het *random forest* model dat de kans op een *high-response* voor elk peptide zal berekenen. Deze kansberekening kan gebruikt worden om de peptides te rangschikken naargelang hun score. Ten slotte werden de bekomen peptiden geblast om te kijken of ze inderdaad uniek zijn voor het betreffende eiwit. Een voorbeeld is de analyse voor de peptiden van Gelsoline (tabel 8). Om een geschikt proteotypisch peptide te selecteren moet het peptide enerzijds uniek zijn, met een *Q-cover* en *Ident-score* van 100%, en anderzijds een goede ESP-score toegewezen krijgen. Bij het laatste peptide van Gelsoline (REVQGFESATFLGYFKS), verkregen door ESP-predictor vond men een *Q-cover* van 100%, maar een *Ident-score* van 94% voor het eiwit Calsequestrine (HUMAAN). Dit wil dus zeggen dat de ingegeven sequentie volledig gelijk is maar dat het peptide niet uniek is voor één eiwit en dus niet gebruikt kan worden als proteotypisch peptide voor Gelsoline. Uiteindelijk werden voor Gelsoline de volgende proteotypische peptiden geselecteerd: AGALNSNDAFVLK en QTQVSVLPEGGETPLFK. Er werden steeds twee PTPs geselecteerd voor elke biomerker. Om de kans op correcte identificatie van een eiwit in een complex staal zoals cervicovaginaal vocht te verhogen kiest men voor twee PTPs in plaats van één per peptide.

Om deze proteotypische peptiden nu te gebruiken in een MRM experiment moeten ze isotopisch gelabeld worden door gebruik te maken van ¹³C of ¹⁵N. Deze peptiden werden aangekocht bij ThermoFisher SCIENTIFIC in een hoeveelheid van 15-30nmol per peptide.

Tabel 8. De mogelijke proteotypische peptiden voor Gelsoline. De Q-cover geeft het percentage weer waarvan de gevonden sequentie exact overeen komt met de gevraagde sequentie. De E-waarde geeft de kans weer dat het peptide dezelfde of een hogere score heeft gebaseerd op toeval. De Ident-score geeft weer hoe zeker de database is over het gevonden eiwit voor dat peptide. Deze score moet 100% zijn om te bevestigen dat het gevonden peptide zeker afkomstig is van Gelsoline. De ESP-score moet zo hoog mogelijk zijn en de Q-cover en Ident-score 100% om een goed PTP te zijn. De t peptide niet uniek is voor dit eiwit ligt deze score lager E-waarde moet zo laag mogelijk zijn. AZ: aminozuur. Ident. : identiteit.

Peptide	# AZ	ESP-score	Uniek	Q-cover	E-waarde	Ident.
AGALNSNDAFVLK	13	0,74504	ja	100%	2,00E -06	100%
QTQVSVLPEGGETPLFK	17	0,70456	ja	100%	8,00E -11	100%
KHVVPNEVVVQRL	13	0,58196	Ja	100%	1,00E -06	100%
TPSAAYLWVGTGASEAEK	18	0,52512	Ja	100%	8,00E -12	100%
REVQGFESATFLGYFKS	17	0,16718	nee	100%	6,60	94%

11 ELISA



Figuur 6. ELISA protocol. Het ELISA protocol zoals beschreven in de kit van Cusabio®. HRP: Horseradisch peroxidase. TBM: tetramethylbenzidine dat als substraat dient voor kleurreactie.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is de techniek die zal worden toegepast bij de kwantificatie van Alfa-actinine-4 in de verschillende stalen. De gebruikte ELISA is een sandwich ELISA waarbij het oppervlak van een 96-wellplaat is gecoat met een antilichaam voor ACTN4. De overige vrije bindingsplaatsen op de plaat worden geblokkeerd zodat aspecifieke binding vermeden wordt. Wanneer het staal op de plaat wordt aangebracht en ACTN4 hierin aanwezig is, kan het gaan binden aan het antilichaam dat op de plaat gecoat werd. Vervolgens zal een secundair antilichaam, dat gebonden is met biotine en gericht is tegen ACTN4 aan het assay worden toegevoegd. Het Alfa-actinine-4 eiwit zit nu gesandwiched tussen de twee antilichamen, vandaar de naam sandwich-ELISA. Biotine heeft een hoge affiniteit voor streptavidine dat gekoppeld is aan horseradisch peroxidase (HRP) dat 3', 5'-tetramethylbenzidine (TMB) als substraat gebruikt en dit zal oxideren tot 3' 5'-tetramethylbenzidine diamine dat voor een blauwe kleurverandering van de solutie zorgt. Deze kleurverandering kan gelezen worden bij 450nm via een spectrofotometer. Het exacte protocol is beschreven in figuur 4. Men voegt bij ELISA steeds een verdunningsreeks met een gekende concentratie van standaard, opgelost in sample diluent toe (tabel 9). In dit geval is de standaard het

ACTN4-eiwit zodat men hiervan een calibratiecurve kan opstellen waaruit men dan de absolute concentratie van ACTN4 in de verschillende patiënten stalen kan detecteren. Dit is met western blot niet mogelijk omdat men daar enkel de breedte van de band kan meten en deze techniek dus minder gevoelig is. ELISA is een zeer kwantitatieve, robuuste techniek, die een *high-throughput* screening toelaat, maar is door het gebruik van de verschillende antilichamen wel duurder. Desalniettemin wordt het gebruik van de techniek gelimiteerd omdat er vaak relatief grote volumes staal vereist zijn en daarnaast slechts één antigeen gedetecteerd kan worden per analyse (Kohler and Seitz, 2012). Een ander nadeel van ELISA is de noodzakelijke aanwezigheid van een specifiek antilichaam voor het onderzochte eiwit. Dit nadeel kan omzeild worden door massaspectrometrie. De gebruikte ELISA is deze van Cusabio® met sensitiviteit voor ACTN4 van 7,8pg/ml.

Tabel 9. De verdunningsreeks van de ACTN4-standaard van de ELISA kit.

Vial	Standaard	Sample diluent	Concentratie (pg/ml)
7 (stock)	250 µl Stock	0 µl	2000
6	250 µl van A	250 µl	1000
5	250 µl van B	250 µl	500
4	250 µl van C	250 µl	250
3	250 µl van D	250 µl	125
2	250 µl van E	250 µl	62,5
1	250 µl van F	250 µl	31,25
Blanco	0 µl	250 µl	0

Resultaten

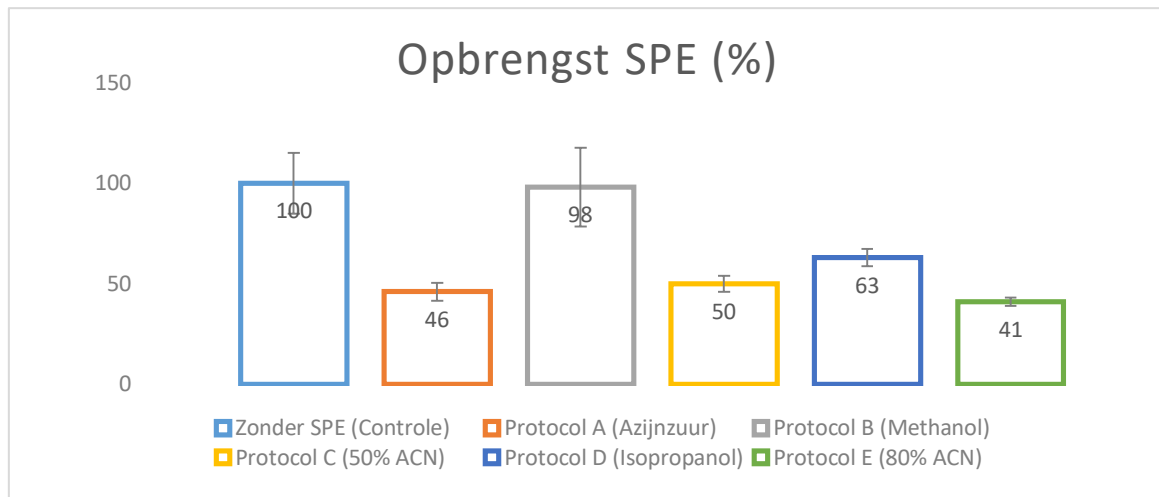
1 Selectie protocol SPE

Na trypsinisatie blijven er naast de bekomen peptiden ook zouten en afvalstoffen van de buffers achter, maar deze kunnen interfereren bij verdere analysetechnieken. Om deze stoffen zoveel mogelijk te verwijderen wordt gebruik gemaakt van *solid phase* extractie (SPE). Om na te gaan welk protocol optimaal is om een staal te reinigen van deze contaminanten, werden vijf verschillende procedures onderling met elkaar vergeleken. Als controle procedure werd er een niet ontzout staal gelopen over een C4-kolom (zie materiaal en methode). Om te bepalen welk van de vijf in de literatuur meest voorkomende protocols de beste ontzouting via SPE en het grootste eiwitrendement oplevert werd een experiment opgezet met een eiwitstandaard van Sigma die vier eiwitten bevat, namelijk: Ribonuclease A, Cytochroom c, Holo-transferrine en Apomyoglobine. Het experiment werd in triplo uitgevoerd waarbij elk protocol terzelfdertijd drie maal werd doorlopen met deze standaard die vooraf getrypsiniseerd werd. Per protocol werd 200µg digest geladen. Elk protocol werd simultaan in triplo doorlopen om grote verschillen in doorlooptijd te vermijden. Zo kan ook de reproduceerbaarheid van elk protocol worden nagegaan. Het eluaat werd geanalyseerd met behulp van RP-HPLC op basis van de AUC.

Tabel 10. De resultaten van de verschillende SPE protocols. Deze werden ook vergeleken met de resultaten van Nick Valkenburg (NV) uit 2014. De standaard deviatie (St. Dev) werd ook bepaald voor elk protocol.

	Protocol A (Azijnzuur)	Protocol B (Methanol)	Protocol C (50% ACN)	Protocol D (Isopropanol)	Protocol E (80% ACN)
Voor SPE (µg)	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Na SPE, gemiddelde (µg)	92,64	196,98	100,29	125,34	82,05
St Dev (µg)	20,22	41,78	15,28	14,19	9,26
OPBRENGST (%)	55,14	98,49	50,41	62,67	41,02
St Dev (%)	10,11	20,89	7,64	7,09	4,63
OPBRENGST NV (%)	44,14	96,30	53,40	37,96	48,46

In bovenstaande tabel staan de resultaten opgesteld van de verschillende SPE-eluties van het nieuwe en het voorgaande experiment. Hieruit is duidelijk op te maken dat protocol B op basis van methanol (zie materiaal en methode) de hoogste opbrengst geeft. Dit wordt ook duidelijk wanneer men dit grafisch voorstelt (figuur 7). De opbrengst per protocol van het huidige experiment ligt in trend Nick Valkenburg zijn resultaten, met uitzondering van de opbrengst van protocol D. Het verschil in pakking van de kolom is hiervan de voornaamste oorzaak, maar ook het soort geladen staal (Standaard met 4 eiwitten versus een Vaglav-pool) of de gemiddelde doorlooptijd kunnen aan de basis liggen voor dit verschil in opbrengst. Op basis van dit resultaat werden ook alle patiënten stalen na trypsinisatie ontzout door middel van het protocol met methanol.



Figuur 7. De opbrengst (%) van de verschillende protocols om te ontzouten na trypisinisatie, vergeleken met een niet ontzout staal geanalyseerd via RP-C18-HPLC. De standaard deviatie wordt ook voor elk protocol weergegeven.

2 Optimalisatie isotopisch gelabelde proteotypische peptiden

In trippel quadrupool MS/MS opstellingen wordt de eerste quadrupool gebruikt om de precursor te selecteren. De tweede quadrupool wordt gebruikt als collisiekamer waarin precursor-ionen gefragmenteerd worden door te botsen met een collisiegas, in de meeste gevallen argon. De laatste quadrupool selecteert en detecteert de fragmenten afkomstig van deze precursorionen. Elk peptide heeft een gekende m/z -waarde in massaspectrometrie en resulteert in fragmenten met unieke m/z -waarden in MS/MS.

Om een zo gevoelig mogelijk MRM-experiment op te zetten moet eerst individueel van elk isotopisch gelabeld PTP een aantal condities bepaald worden, namelijk: de retentietijd, collisie-energie, optimale verdunning en benodigd volume. De aangekochte *HeavyPeptideTMAQUA Basic* peptiden van ThermoFisher SCIENTIFIC werden eerst opgelost in LC-MS H₂O + 0,1% FA zodat een concentratie van 1 µg/µl bereikt werd. Vervolgens werd er een verdunningsreeks van elk peptide opgesteld om de maximale verdunningsgraad te kunnen bepalen waarbij het peptide nog voldoende signaal geeft. Dit proces van optimalisatie wordt hieronder weergegeven voor BM29_1, het eerste PTP van Calcycline (S100A6) (LQDAEIAAR). De belangrijkste chromatogrammen en spectra van de optimalisatie van CC29_1 zijn terug te vinden als bijlage 2.

Als eerste stap in het optimalisatieproces van een PTP werd een verkennende MS-scan en UPLC-analyse uitgevoerd. Hierdoor kan men de elutietijd en de m/z -waarde van het precursor-ion bepalen. Het peptide heeft een moleculair gewicht van 918,98Da (1-waardig geladen) dus 459,49 Da als het 2-waardig- en 306,33 Da als het 3-waardig geladen zou zijn. Op het chromatogram (bijlage 2, figuur 1) is duidelijk te zien dat bij 460,50 Da, op 2,48min, het hoogste signaal voorkomt (7,77E7). Dit wordt nog eens nagekeken op het bijbehorende spectrum (bijlage 2, figuur 2). Het hoogste signaal is daar bij 460,53 Da. Deze m/z -waarde wordt gekozen als precursor-ion, het peptide is 2-waardig geladen. De collisie-energie nodig voor optimale fragmentatie van een peptide hangt af van zijn fysicochemische eigenschappen. Op basis van de MS-scan werd 640,53 Da geselecteerd als precursor voor de *daughter scan* en wordt de collisie-energie ingesteld op 18eV aangezien dit een goede fragmentatie oplevert. Indien dit niet het geval is moet de collisie-energie aangepast worden. De energie moet verhoogd worden als de precursor zelf nog een te hoog signaal geeft en er weinig fragmentatie optrad. Bij CC29_1 werden er 6 fragmenten met een bepaalde m/z -waarde uit de *daughter scan* geselecteerd voor de MRM scan, namelijk: 321,31; 429,09; 492,91; 679,04; 790,39 en 808,14. Omdat men bij een

MRM-analyse gevoeliger gaat meten dan bij de *daughter scan*, omdat q1 en q3 gefixeerd zijn, kan de MRM analyse gelopen worden in een verdunning die lager is dan diegene gebruikt bij de *daughter scan* (indien daar voldoende signaal gemeten werd). De *daughter scan* werd in de 3^{de} verdunning gemeten, dus wordt de MRM-analyse in de 4^{de} verdunning gemeten ([PTP] 1pg/μl). De signaal/ruis verhouding is voor de meeste fragmenten is goed, enkel het fragment van 321,31Da onderscheidt zich te weinig van de ruis en wordt weggelaten (bijlage 2, figuur 3).

Dit optimalisatieproces werd nu voor de volgende biomerkers uitgevoerd: Gelsoline (Proteotypische peptiden CC18_1, CC18_2), Calgranuline B (CC31_1, CC31_2), Calpastatine (CC32_1, CC32_2), Angiotensinogeen (CC12_1, CC12_2), Cathepsine B (CC14_1), Lactaat Dehydrogenase A (CC30_1, CC30_2), 14-3-3-proteïne epsilon (CC08_1), Calcyline (CC29_1, CC29_2) en F-actine capping proteïne subunit alfa-2 (CC17_1, CC17_2). De resultaten zijn verzameld in onderstaande tabel (tabel 11). Van Cathepsine B en 14-3-3 proteïne epsilon (CC08_2) werd maar 1 peptide geoptimaliseerd. Het andere peptide was wel terug te vinden op de MS-scan, maar slechts in de meest geconcentreerde verdunning (0,1μg/μl). Dit zou betekenen dat men de patiënten stalen sterk zou moeten spiken indien men deze peptiden nog wil detecteren. Daarom werd beslist CC14_2 en CC08_2 uit de finale MRM analyse weg te laten.

Tabel 11. Gegevens van de optimalisatie van de verschillende PTPs. BM: biemerker. CE: collision energie. Verd: verdunning waarbij het signaal van het peptide nog hoog genoeg was voor detectie (eerste verdunning: 0,1pg/ml en steeds 1/10 verder verdund). Het rode AZ is het isotopisch gelabelde peptide dat voor een verschil in Moleculair gewicht zal zorgen tussen het endogeen en het gespikete peptide. W: lading van het peptide. Capza 2: F-actin-capping proteïne subunit alpha-2

EIWIT	BM	Elutie (min)	Precursor (Da)	CE (eV)	Daughter (Da)	Verd.	Sequentie/ Mw label
Gelsoline	18_1	3,65	663,95 (2w)	20	313,21 427,12 479,03	4	AGALNSNDAFV LK 7 Da
	18_2	4,15	921,20 (2w)	26	336,55 527,53 643,45 912,18 1084,78	4	QTQVSVLPEGGETPL FK 10 Da
Calgranuline B	31_1	2,71	489,70 (3w)	18	311,44 354,59 623,29 651,33 717,59 848,95	5	LGHPDTLNQGE FK 10 Da
	31_2	3,50	583,17 (3w)	18	552,17 667,06 767,87 853,50 967,37	4	VIEHIMEDLDTN ADK 4 Da
Calpastatine	32_1	3,02	876,47 (2w)	22	468,01 784,38 1284,74 1388,31	4	AIPVSQQMEGPHL PNK 6 Da
	32_2	2,93	626,98 (2w)	20	383,26 436,71 520,08 556,38 871,10 1039,44	5	AAAPAPVSEAV CR 10 Da

EIWIT	BM	Elutie (min)	Precursor (Da)	CE (eV)	Daughters (Da)	Verd.	Sequentie/ Mw label
Angiotensinogeen	12_1	4,27	723,30 (2w)	19	434,90 675,08 806,44 983,64 1131,21	2	SLDFTELDVAAEK 8 Da
	12_2	4,02	651,10 (2w)	20	443,07 460,46 574,04 727,85 840,81 988,34	4	DPTFIPAPIQAK 4 Da
Cathepsine B	14_1	3,57	591,90 (3w)	18	359,51 447,83 518,99 564,38 619,20 840,93	2	GQDHCIESEVVAGIPR 6 Da
Lactaat Dehydrogenase A	30_1	3,69	564,02 (2w)	18	273,92 454,04 639,77 753,30 968,73	3	SADTLWGIQK 8 Da
	30_2	2,57	569,60 (2w)	18	295,93 723,44 824,85 937,67	4	VTLTSEEEAR 4 Da
14-3-3 protein epsilon	08_1	2,89	599,90 (2w)	18	310,15 484,20 599,71 927,48 1052,35	4	EAAENSLVAYK 4 Da
Calcycline (S100A6)	29_1	2,47	460,50 (2w)	18	429,09 492,91 679,04 790,39 808,14	4	LQDAEIIAR 4 Da
	29_2	6,62	650,50 (3w)	18	583,40 717,79 822,40 1096,25	2	MACPLDQAIGLLVAIFHK 8 Da
Capza 2	17_1	3,52	876,99 (2w)	27	323,15 358,34 672,93 1302,26	3	DIQDSLTVSNEVQTAK 4 Da
	17_2	4,32	806,86 (2w)	18	215,11 463,20 575,55 673,82 1076,50 1149,82	3	FTITPSTTQVVGILK 7 Da

3 Voorbereiding finale multiplex analyse op de patiënten-stalen

Na de optimalisatie van de verschillende PTPs moet er een finale MRM-run worden opgesteld. De elutietijd van de verschillende peptiden is hierbij belangrijk, deze mag namelijk niet te sterk overlappen tussen de peptiden onderling om goede sensitiviteit van de merkers te behouden. Door de quadropool op het juiste moment te fixeren op de exacte m/z-waarde van de endogene peptiden kunnen deze toch gedetecteerd worden in een complex staal. Immers, met de fixatie van de quadropool stijgt de gevoeligheid van de massaspectrometrische detectie: enkel de peptiden met een m/z-waarde die exact overeenkomt met de ingestelde fixatie worden geanalyseerd. Door zo weinig mogelijk overlap te hebben tussen de verschillende fixaties moet de quadropool niet steeds wisselen tussen de twee instellingen en wordt er meer tijd besteed aan de detectie van het peptide. Daarom werd er beslist om de peptiden te verdelen over twee analyses (tabel 12). De tabel geeft enkel de fixatie voor de isotopisch gelabelde peptiden weer, maar simultaan wordt er ook gefixeerd voor de niet-verzwaarde endogene peptiden in het patiënten staal. Een voorbeeld wordt hieronder weergegeven voor BM29_1, het eerste PTP van Calcycline (S100A6) (LQDAEIAR). Het is een 2-waardig geladen precursor-ion met een moleculair gewicht van 460,50 Da. De geselecteerde fragmenten zijn bij 429,09 Da; 492,91Da; 679,04 Da; 790,39 Da en 808,14 Da. Het isotopisch gelabelde AZ is Alanine (A) en heeft een Mw-verschil van 4 Da. Het endogene precursor-ion heeft dan een moleculair gewicht van 458,50Da. Het moleculair gewicht van de fragmenten wordt dan: 427,09 Da; 488,91 Da; 786,39 Da en 804,14 Da. Isotopisch gelabelde aminozuren en hun verschil in moleculair gewicht zijn terug te vinden in tabel 11.

Tabel 12. Onderverdeling peptiden voor multiplex run. De peptiden werden over twee runs verdeeld om de sensitiviteit zo hoog mogelijk te houden. Peptiden zijn gerangschikt volgens begin- en eindtijd waarop de massaspectrometer gefixeerd staat. Capza2: F-actine capping proteïne alfa-2.

EIWIT	BM	Elutie (min)	Begintijd (min)	eindtijd (min)
RUN 1				
Calcycline (S100A6)	29_1	2,47	2,00	2,70
Calpastatine	32_2	2,93	2,70	3,10
Calpastatine	32_1	3,02	2,90	3,20
PSME1	00_1	3,17	3,10	3,35
PSME1	00_2	3,47	3,35	3,55
Capza2	17_1	3,52	3,45	3,65
Gelsoline	18_1	3,65	3,55	3,90
Gelsoline	18_2	4,15	3,90	4,25
Capza2	17_2	4,32	4,25	5,05
Calcycline (S100A6)	29_2	6,62	5,05	7,00
RUN 2				
LDHA	30_2	2,57	2,35	2,70
Calgranuline B	31_1	2,71	2,60	2,90
14-3-3 proteïn epsilon	08_1	2,89	2,85	3,15
Calgranuline B	31_2	3,50	3,15	3,60
Cathepsine B	14_1	3,57	3,50	3,75
LDHA	30_1	3,69	3,65	4,15
MIF	01_2	3,82	3,75	4,00
Angiotensinogeen	12_2	4,02	3,90	4,15
MIF	01_1	4,16	4,05	4,30
Angiotensinogeen	12_1	4,27	4,15	7,00

Als laatste stap werd er gecontroleerd of alle isotopisch gelabelde peptiden van elkaar te onderscheiden zijn op het chromatogram van de analyse. Er werd 5µl van de isotopisch gelabelde peptidenpool, dus zonder aanwezigheid van een patiënten staal, geïnjecteerd. Deze stap is tevens een geschikte manier om te controleren of er geen signaal aanwezig is in de kanalen van de endogene peptiden (bijlage 3).

4 Finale multiplex analyse op de patiënten-stalen

4.1 Spiken patiënten-stalen

De patiënten-stalen moeten gespiked worden met de isotopisch gelabelde peptiden, maar dit moet zo gebeuren dat de PTP nog voldoende signaal geven nadat ze aan het Vaglav-staal zijn toegevoegd. Omdat tijdens het optimalisatieproces werd bepaald bij welke concentratie het signaal van het PTP nog voldoende hoog was, moet dit mee in rekening gebracht worden bij het spiken (tabel 11). Bij de finale multiplex analyse werd steeds een totaal volume van 5µl geïnjecteerd. De PTP-pool en het staal zijn hierin in een 50%-verhouding aanwezig (2,5µl staal en 2,5µl PTP pool). Er werd nu berekend in welke concentratie elk isotopisch gelabeld peptide aanwezig moet zijn in de PTP-pool (tabel 13).

Tabel 13. Spiking PTPs. Op basis van de optimalisatie van de PTP (Resultaten 2) werd er berekend hoeveel peptide (µg) er nodig is om een goed signaal te verkrijgen in een complex staal. Vervolgens werd er berekend hoeveel peptide er dan nodig is voor een injectievolume van 5µl. Ten slotte werd er rekening gehouden met de verhouding 50% PTP-pool en 50% totaal eiwit. Capza 2: F-actin-capping protein subunit alpha-2.

EIWIT	BM	Concentratie (pg/ml)	Volume voor optimalisatie (µl)	Benodigd peptide (µg)	Benodigd peptide (µg)/ 5µl	Benodigd peptide (µg)/staal
Gelsoline	18_1	0,00010	1,5	1,5E-04	0,00050	0,000250
	18_2	0,00010	5,0	5,0E-04	0,00050	0,000250
Calgranuline B	31_1	0,00010	1,0	1,0E-04	0,00050	0,000250
	31_2	0,00010	2,5	2,5E-04	0,00050	0,000250
Calpastatine	32_1	0,00010	2,5	2,5E-04	0,00050	0,000250
	32_2	0,00001	2,5	2,5E-05	0,00005	0,000025
Angiotensinogeen	12_1	0,01000	2,5	2,5E-02	0,05000	0,025000
	12_2	0,00001	1,0	1,0E-04	0,00050	0,000250
Cathepsine B	14_1	0,01000	2,5	2,5E-02	0,05000	0,025000
Lactaat Dehydrogenase A	30_1	0,00100	3,0	3,0E-03	0,00500	0,002500
	30_2	0,00010	2,5	2,5E-04	0,00050	0,000250
14-3-3 Proteïne epsilon	08_1	0,00010	2,5	2,5E-04	0,00050	0,000250
Calcycline (S100A6)	29_1	0,00010	2,5	2,5E-04	0,00050	0,000250
	29_2	0,00100	3,0	3,0E-03	0,00500	0,002500
Capza 2	17_1	0,01000	3,0	3,0E-02	0,05000	0,025000
	17_2	0,00100	2,5	2,5E-03	0,00500	0,002500
PSME1	00_2	0,00100	4,0	4,0E-03	0,00500	0,002500
MIF	01_1	0,00100	4,0	4,0E-03	0,00500	0,002500
	01_2	0,00100	4,0	4,0E-03	0,00500	0,002500

De patiënten-stalen werden allemaal volgens dezelfde procedure behandeld. Er werd 160µg eiwit van elk staal getrypsiniseerd, waarna overtollige afvalstoffen en zouten verwijderd werden via *solid phase* extractie. Deze methode gaf, zoals eerder besproken in de resultaten, een eiwitopbrengst van 98%. Nadien werden alle stalen volledig droog gedampt in de Savant Speedvac SC100. Droogdamping geeft een eiwitopbrengst van 80% (Valkenburg N. and Van Ostade X., 2014b). Na deze procedures blijft er 125,44 µg eiwit over. Deze hoeveelheid werd opgelost in 25µl 97%-3% ACN +0,1% FA.

4.2 Data-analyse multiplex experiment op patiënten-stalen

Alle 20 isotopisch gelabelde peptiden en hun endogene vorm werden gemeten op 29 stalen: zeven stalen van 'gezonde' patiënten, één staal van een 'gezonde' patiënt met additionele HIV-infectie, vier stalen van 'gezonde' patiënten met een HPV-infectie, 8 LSIL-stalen, 2 LSIL-stalen met HIV en 7 HSIL-stalen. De stalen werden één per één geanalyseerd door middel van UPLC chromatografie gekoppeld aan trippel quadrupool massaspectrometrie op het Xevo toestel. De analyse per staal duurde 10 minuten per run. Alle data werden verwerkt met MassLynx V4.1 (Waters). Vervolgens werd er een AUC-bepaling uitgevoerd op elk verkregen TIC-chromatogram om later naar de verhouding tussen endogeen- en isotopisch gelabeld peptide te kunnen kijken. TIC-chromatogrammen geven de totale gemeten intensiteit binnen een analyse weer. Een selectie van deze chromatogrammen, namelijk al diegene voor 14-3-3 Proteïne epsilon in elk staal, wordt weergegeven in bijlage 4. Er werd ook steeds gecontroleerd of de elutietijd van de geïntegreerde piek overeenkwam met die van het te bepalen peptide. Indien dit niet het geval was werd er bij dat peptide in de analyse een nul ingevuld; als er helemaal geen signaal te zien was werd dit aangeduid met '/'. Om nu de verhouding te bepalen van het endogene peptide ten opzichte van het gespikete peptide werd de bekomen AUC-waarde van het endogene peptide gedeeld door de bekomen AUC-waarde van het gespikete peptide. Dit geeft enkel een relatieve schatting weer. Om de absolute hoeveelheid endogeen peptide die in het staal aanwezig is te berekenen moet de AUC-waarde van de verhouding tussen endogeen en gespikete peptide vermenigvuldigd worden met vooraf toegevoegde concentratie van het gespikete peptide aan het staal (zie tabel resultaten 4.1). De finale concentraties werden uitgedrukt in pg/mg en niet in pg/ml. Op deze manier krijgt men dan meer inzicht over de aanwezigheid van een peptide in eenzelfde massa totaal eiwit in elk staal, namelijk 0,125mg. De tabel met alle concentraties in pg/mg is terug te vinden in bijlage 4.

Als men naar de resultaten in bijlage 5 kijkt valt het direct op dat CC29_2, het tweede peptide van Calcycline voornamelijk een nul heeft staan in de data analyse. De fixatietijd van de quadrupool voor dit peptide was niet voldoende lang ingesteld en het endogeen signaal kon daarom niet gedetecteerd worden. Het signaal van het gespikete peptide werd wel steeds gedetecteerd.

Verder kan men zien dat de concentraties van beide peptiden van eenzelfde eiwit in enkele gevallen ver uit elkaar liggen voor hetzelfde staal. Dit kan deels verklaard worden door de moeilijkere ionisatie van het ene peptide ten opzichte van het andere, als gevolg van de verschillen in AZ-sequentie. Bovendien is het dc- en rf spanningsveld dat samen als filter van de quadrupool werkt, anders ingesteld per peptide. Als tijdens de optimalisatie deze instellingen niet helemaal juist zijn afgesteld op de correcte m/z-waarde van dat peptide, kan de gedetecteerde hoeveelheid van de ene precursor verschillen ten opzichte van het andere precursorpeptide van datzelfde eiwit. Dit kan de verklaring zijn voor het verschil in concentratie van onder andere de F-actine capping proteïne subunit alfa-2. De resultaten van beide peptiden zijn immers erg verschillend binnen eenzelfde staal.

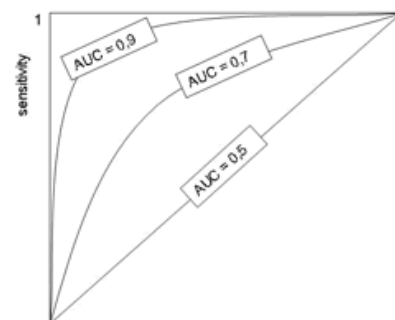
Tenslotte ziet men dat er bij sommige peptiden geen signaal gevonden werd in de verschillende stalen, aangeduid met '/'. Dit kan verklaard worden door de complexiteit van de Vaglav-stalen ten opzichte van de optimalisatieprocedure waar enkel één bepaald peptide aanwezig was. In een complex staal kan er 'competitie voor de ionisatie-energie' optreden waardoor bepaalde componenten beter detecteerbaar zijn dan anderen. Dit is vermoedelijk het geval bij het peptide van PSME1, MIF_1 en het peptide van Cathepsine B.

4.3 ROC-curves multiplex analyse op de patiënten-stalen

Als je een peptide wil gebruiken in een diagnostisch assay om bijvoorbeeld precancereuze van 'gezonde' patiënten te kunnen onderscheiden is de sensitiviteit en de specificiteit van dit peptide voor deze discriminatie belangrijk. Een hoge sensitiviteit van een test verzekert dat zieke patiënten door de test ook als ziek worden aangeduid (echt positieven / (echt positieven + vals negatieven). Specificiteit van een test bepaalt potentie om 'niet-zieke' patiënten ook zo te identificeren (echt negatieven/ echt negatieven + vals positieven). Vals positieven zijn personen die gezond zijn maar door de test toch incorrect als ziek worden geïdentificeerd. Vals negatieven zijn personen die ziek zijn maar door de test als gezond worden aangeduid. Omdat we graag de discriminatiedrempel of *cutoff*-waarde van de verschillende peptiden willen nagaan werden er voor elk peptide ROC-curves opgesteld waaruit deze afgelezen kunnen worden. De *cutoff*-waarde geeft weer bij welke concentratie in pg/mg de discriminatie tussen twee condities (ziek versus gezond) mogelijk is. De ROC-curves zijn opgesteld door de sensitiviteit van de merker uit te drukken t.o.v. 1-specificiteit. Elk punt op de ROC-curve correspondeert met een bepaalde discriminatiedrempel. Een test met een perfecte discriminatie herkent men aan een ROC-curve die de linkerbovenhoek van de figuur benadert (100% sensitiviteit en specificiteit). Men wil dus een test met een hoge sensitiviteit waarbij 1-specificiteit een lage waarde heeft waardoor de specificiteit op zichzelf hoog is. Door met 1-specificiteit te werken is het echter veel gemakkelijker om de AUC of oppervlakte onder de curve van een merker berekenen. Hoe sterker de grafiek naar de linker bovenhoek nijgt, hoe hoger deze AUC-waarde en hoe meer accuraat het peptide voor een bepaalde conditie kan discrimineren (Metz, 1978). Men kan dus a.d.h.v. de vorm van de ROC-curve de accuraatheid van het peptide te weten komen. De accuraatheid van een test wordt met onderstaande formule berekend:

$$\frac{\text{aantal echt positieven} + \text{aantal echt negatieven}}{\text{totale patiëntenpopulatie}}$$

Bij een ROC-curve met een AUC-waarde van 1 kan het onderscheid tussen de condities perfect bepaald worden (figuur 8). De biomarker heeft alle patiënten correct kunnen identificeren en er zijn dus geen vals positieve of vals negatieve resultaten. Het geeft een accuraatheid van 100% weer en heeft dus een perfecte sensitiviteit en specificiteit. Een test die scoort tussen 1-0,9 komt niet vaak voor in de praktijk, maar is het ideaal dat men wil bereiken. Een biomarker met een AUC-waarde van 0,8-0,9 is een indicatieve biomarker en is op populatieniveau meer realistisch. Een biomarker met een AUC-waarde tussen 0,7-0,8 heeft zeker zijn voordelen en kan bijvoorbeeld gebruikt worden in combinaties met andere biomarkers, maar is op zichzelf niet heel betrouwbaar of accuraat om de uitkomst van een patiënt correct te voorspellen. Een AUC-waarde die tussen 0,6-,0,7 valt is een slechte test en wordt zelden gebruikt gebaseerd op zijn lage sensitiviteit en specificiteit. Een biomarker met een AUC-waarde onder 0,6 is niet geschikt om enige diagnostische waarde te verschaffen en kan dus best niet gebruikt worden omdat het de *outcome* van een patiënt niet correct kan voorspellen (Zweig and Campbell, 1993).



Figuur 8. ROC-curves. Weergave van de verschillende AUC-waarden.

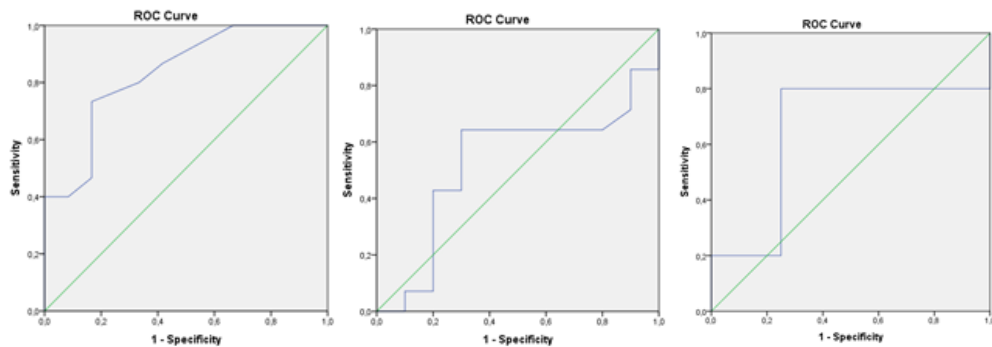
4.3.1 Onderscheid 1: 'gezond' versus 'precancereus' (LSIL + HSIL)

Er werden op basis van de berekende concentraties in pg/mg ROC-curves opgesteld voor de verschillende peptiden. Elke ROC-curve opgesteld voor dit eerste onderscheid is terug te vinden in bijlage 6. Vervolgens werd er nagegaan welke van de peptiden correct kon discrimineren tussen stalen van 'gezonde' patiënten en stalen van patiënten met een precancereus letsel (LSIL +HSIL). De AUC- en *cutoff*-waarde werd ook voor elk peptide berekend en zijn terug te vinden in tabel 14.

Tabel 14. De AUC- en *cutoff*-waarden voor de verschillende peptiden. De AUC-waarde geeft de accuraatheid van het peptide voor het eerste onderscheid weer ('gezond'/ precancereus). De *cutoff*-waarde geeft weer bij welke concentratie (pg/mg) deze discriminatie optreedt. De weergegeven sensitiviteit en specificiteit, in procent, zijn diegene bijhorend aan de *cutoff*-waarde (en af te lezen uit de ROC-curves). Angiotensinogeen (CC12_1), LDHA (CC30_1) en MIF (MIF_2) komen op basis van hun AUC-waarde naar voor als potentiële biomerkers voor het eerste onderscheid (omkaderd).

EIWIT	BM	AUC-waarde: gezond/ precancereus (LSIL + HSIL)	Std. Error	<i>Cutoff</i> (pg/mg)	Sensitiviteit (%)	specificiteit (%)
CALCYCLINE (S100A6)	CC29_1	0,45	0,12	1369,18	50,00	66,70
	CC29_2	/	/	/	/	/
CALPASTATINE	CC32_1	0,58	0,14	89,68	85,70	44,40
	CC32_2	0,51	0,15	243,94	69,20	37,50
GELSOLINE	CC18_1	0,63	0,11	2409,52	75,00	33,30
	CC18_2	0,52	0,11	579,96	75,00	23,10
CAPZA2	CC17_1	0,63	0,11	1218510,84	56,30	83,30
	CC17_2	0,47	0,11	3348,21	41,18	58,30
PSME1	PSME1_2	0,65	0,21	478,32	80,00	75,00
CALGRANULINE B	CC31_1	0,58	0,12	3138,95	71,43	53,80
	CC31_2	0,62	0,11	58982,38	64,70	53,80
ANGIOTENSINOGEEN	CC12_1	0,83	0,08	4185,27	73,33	83,30
	CC12_2	0,53	0,13	2080,68	64,29	70,00
LDHA	CC30_1	0,81	0,11	3109,06	62,50	85,70
	CC30_2	0,57	0,11	48268,10	52,94	66,70
14-3-3 Proteïne ε	CC08_1	0,62	0,11	1644,21	68,80	58,30
CATHEPSINE B	CC14_1	/	/	/	/	/
MIF	MIF_1	/	/	/	/	/
	MIF_2	0,83	0,09	1853,48	85,70	31,20

Omdat sommige peptiden in de Multiplex-analyse maar weinig signaal of weinig resultaat opleverden werd er beslist om deze peptiden geen ROC-curves op te stellen omdat deze een vertekend beeld van de realiteit kunnen geven. Dit is het geval bij CC29_2, door de verkeerd ingestelde fixatietijd, bij CC14_1 en MIF_1. Het grote verschil in AUC-waarde tussen twee peptiden van eenzelfde eiwit kan dan ook hier weer verklaard worden door het verschil in ionisatiegraad van beide peptiden. Als een peptide moeilijker zal ioniseren, zal het op de detectiegrens vallen en daardoor voor inconsistente resultaten zorgen. Als men kijkt naar de resultaten kan men zien dat dit het geval is bij Angiotensinogeen (CC12) en LDHA (CC30). CC12_1 heeft een AUC-waarde van 0,83 en CC12_2 van 0,53. CC30_1: geeft 0,81 versus 0,57 bij CC30_2. Het verschil in resultaat is ook terug te vinden in de ROC-curves zelf (figuur 9). De groene lijn in de ROC-curves geeft een test weer met een AUC-waarde van 0,5.



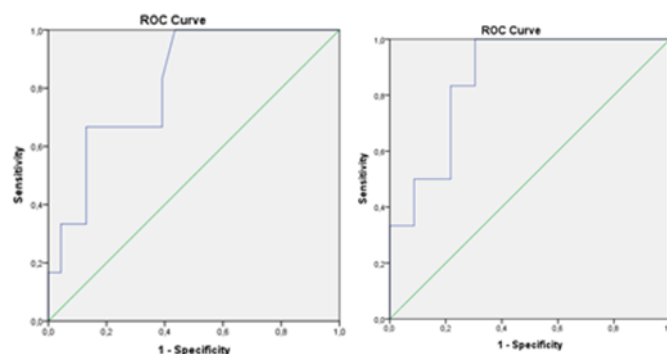
Figuur 9. De ROC-curves van CC12_1 (links) en CC12_2 (midden), de twee peptiden van Angiotensinogeen. De ROC-curve van PSME1 (rechts) die op zich zelf een goed resultaat vertoont, maar in combinatie met de AUC-waarde van 0,65 toch niet geschikt is als peptide voor de correcte discriminatie tussen ‘precancerus’ en ‘gezond’.

Correcte interpretatie van de resultaten gebeurt door naar de combinatie van de ROC-curve en de bijhorende AUC-waarde te kijken. Uit de ROC-curve kan je de sensitiviteit en specificiteit aflezen, terwijl de AUC-waarde de accuraatheid van de merker weergeeft. Op basis van deze combinatie kan men direct concluderen dat de meeste van de geteste peptiden niet in staat zijn correct te discrimineren tussen ‘gezonde’ patiënten en patiënten met een ‘precancerus letsel’. Hun AUC-waarde ligt namelijk onder 0,6 en geeft dus geen betrouwbaar resultaat. Dit is het geval voor beide peptiden van Calcycline, Calpastatine, Gelsoline, F-actine capping proteïne subunit alfa en Calgranuline. Men moet naar de combinatie van de ROC-curve en de AUC-waarde kijken, want onafhankelijk van elkaar kunnen ze foutief geïnterpreteerd worden, zoals het geval zou zijn bij PSME1. De ROC-curve zelf ziet er veelbelovend uit. Maar de AUC-waarde is maar 0,65.

4.3.2 Onderscheid 2: niet-risico- en risicovol voor HSIL (‘gezond’ + LSIL/ HSIL)

De data-analyse werd nu herhaald voor een andere onderscheidende conditie, namelijk de discriminatie van risicovolle- (HSIL) en niet risicovolle patiënten (‘gezond’ + LSIL) voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Daarom is het testen van de verschillende biomerkers onder deze conditie een meerwaarde voor het onderzoek. Ook voor dit onderscheid werden voor alle peptiden ROC-curves, AUC-waarden en *cutoff*-waarden berekend. De resultaten zijn terug te vinden in tabel 15. De ROC-curves zijn voor alle peptiden terug te vinden in bijlage 6.

Omdat sommige peptiden in de Multiplex-analyse maar weinig signaal of weinig resultaat opleverden werd er beslist om deze peptiden geen ROC-curves op te stellen omdat deze een vertekend beeld van de realiteit kunnen geven. Dit was het geval bij CC29_2, CC14_1 en MIF_1.



Figuur 10. De ROC curves van de peptiden van Gelsoline (CC18_1) (links) en 14-3-3 proteïne epsilon (CC08_1) (rechts) onder de conditie: risicovol/ niet risicovol voor HSIL.

Als men naar de resultaten van de AUC-waarden kijkt, komen er andere biomerkers naar boven ten opzichte van het vorige onderscheid (conditie 1: 'gezond'/'precancerous'). Gelsoline, en dan vooral het eerste peptide (CC18_1), heeft een diagnostische AUC-waarde van 0,82 bij dit onderscheid ten opzichte van 0,63 bij het vorige. Ook 14-3-3 proteïne epsilon (CC08_1) komt nu naar voor als potentiële merker met een AUC-waarde van 0,86 ten opzichte van 0,62 bij onderscheid 1. De ROC-curves van beide peptiden tonen een hoge specificiteit en sensitiviteit (figuur 10). Het eerste peptide van LDHA (CC30_1) dat bij onderscheid 1 wel goed scoorde doet dat onder deze voorwaarden niet. Het eerste peptide van Angiotensinogeen (CC12_1) en het tweede peptide van MIF (MIF_2) blijven ook onder dit onderscheid goed scoren. De peptiden van Calcycline, Calpastatine, en Capza2 scoren echter ook onder deze omstandigheden niet goed, hieruit kan geconcludeerd worden dat zij geen diagnostische meerwaarde hebben.

Tabel 15. De AUC-waarde geeft de accuraatheid van het peptide voor het eerste onderscheid weer (niet risicovol/risicovol voor HSIL). De *cutoff*-waarde geeft weer bij welke concentratie (pg/mg) deze discriminatie optreedt. De weergegeven sensitiviteit en specificiteit, in procent, zijn diegene bijhorend aan de *cutoff*-waarde (en af te lezen uit de ROC-curves). CC12_1, CC18_1, CC08_1 en MIF_1 zijn op basis van hun AUC-waarde veelbelovende peptiden om een correcte diagnose te kunnen stellen (omkaderd). Capza2: F-actine-capping proteïne subunit alpha-2.

EWIT	BM	AUC-waarde: Gezond+ LSIL /HSIL	Std, Error	Cutoff (pg/mg)	Sensitiviteit (%)	specificiteit (%)
CALCYCLINE (S100A6)	CC29_1	0,56	0,13	1967,08	60,00	72,70
	CC29_2	/	/	/	/	/
CALPASTATINE	CC32_1	0,33	0,10	113,60	60,00	35,00
	CC32_2	0,59	0,14	123,17	83,30	31,20
GELSOLINE	CC18_1	0,82	0,09	6744,26	66,67	82,60
	CC18_2	0,53	0,13	3617,27	42,86	66,70
CAPZA2	CC17_1	0,50	0,15	1295639,35	42,90	76,20
	CC17_2	0,47	0,12	2272,00	71,43	40,90
PSME1	PSME1_2	0,25	0,21	478,32	50,00	42,90
CALGRANULINE B	CC31_1	0,68	0,15	35126,36	60,00	66,70
	CC31_2	0,43	0,15	20998,09	42,90	77,30
ANGIOTENSINOGEEN	CC12_1	0,79	0,09	5381,06	83,33	63,60
	CC12_2	0,54	0,16	2905,77	60,00	68,40
LDHA	CC30_1	0,60	0,15	10821,91	33,33	84,60
	CC30_2	0,55	0,16	57248,49	57,14	68,20
14-3-3 Protein ε	CC08_1	0,86	0,17	3748,80	83,30	78,30
CATHEPSINE B	CC14_1	/	/	/	/	/
MIF	MIF_1	/	/	/	/	/
	MIF_2	0,81	0,10	5799,59	80,00	59,30

4.3.3 Onderscheid 3: Invloed van HIV

Als laatste wordt er gekeken naar de invloed van HIV op de resultaten van het uitgevoerde multiplex experiment. Dit om te kijken of de discriminerende waarden die we terug vinden niet het gevolg zijn van de HIV-infectie i.p.v. de condities die we onderzoeken. Er zijn 3 stalen met HIV getest: één staal van een 'gezonde' patiënt met additionele HIV-infectie (UZA 14) en twee LSIL-stalen met HIV (UZA 34 en 71). Uit de resultaten, terug te vinden in bijlage 5, komt Cathepsine B naar voor als eiwit waarop HIV een mogelijke invloed kan hebben omdat Cathepsine B in zeer hoge concentraties (pg/mg) aanwezig was in de stalen met additionele HIV-infectie en in veel lagere concentraties terug te vinden was in de andere stalen. Dit wordt even kort verder uitgewerkt in de discussie.

5 ACTN4 ELISA

5.1 Optimale concentratiebepaling

Om de concentratie van ACTN4 te bepalen op de verschillende stalen werd er een sandwich-ELISA van Cusabio® uitgevoerd. Immers, de concentratie van ACTN4 in CVV is te laag om gemeten te worden d.m.v. MRM (Geert Van Raemdonck, persoonlijke mededeling). Er werd steeds een calibratiecurve opgesteld van de ACTN4-standaard, geleverd in de ELISA-kit (verdunningsreeks standaard, zie materiaal en methoden). Vooraleer men de patiënten stalen kon testen voor ACTN4 moest er bepaald worden welke eiwitconcentratie het best geladen kon worden op de ELISA. Dit werd bepaald met behulp van een verdunningsreeks van een Vaglav-pool. Dit is een pool samengesteld uit verschillende vaginale lavage stalen van LSIL en 'gezonde' patiënten. In de thesis van Koen Sniijders werd de optimale concentratie om op een ELISA te laden ook reeds bepaald voor een andere Vaglav-pool. Er werd toen beslist om steeds een concentratie van 1mg/ml te laden (Sniijders K. and Van Ostade X., 2015). Dit experiment werd nu herhaald. Zowel de calibratiecurve van de standaard- als de Vaglav-pool werden in duplo gemeten en er werd steeds 100µl per well geladen. De negatieve concentraties zijn het gevolg van de integratie van de gemeten absorptie in de vergelijking van de standaard (tabel 16). Voor alle stalen werd een blanco correctie uitgevoerd. Men kan uit de resultaten wel besluiten dat een eiwitconcentratie onder 625µg/ml te weinig is om de ACTN4 concentratie te kunnen bepalen. Bovendien vindt men bij de stalen met een concentratie boven 312,50µg/ml een lineair verband terug tussen de halverende Vaglav concentratie en de ACTN4 concentratie. Gebaseerd op deze resultaten werd gekozen om patiënten stalen met een concentratie van 1mg/ml te laden. Dit resultaat bevestigt het resultaat van Koen Sniijders (Sniijders K. and Van Ostade X., 2015).

Tabel 16. Bepaling optimale Vaglav concentratie. De verdunningsreeks van de Vaglav-pool en de concentraties ACTN4 die werden bepaald na integratie in de vergelijking verkregen door het opstellen van een calibratiecurve voor de ACTN4- standaard ($y=0,0004x + 0,0407$).

Staal	[Vaglav pool] (µg/ml)	Volume stock (µl)	Volume diluent buffer (µl)	Gemiddelde [ACTN4] pg/ml	Opbrengst (%)
A	5000,0 (stock Pool)	500,0	0,0	225,8	100
B	2500,0	250,0 van A	250,0	95,8	85%
C	1250,0	250,0 van B	250,0	59,5	100%
D	625,0	250,0 van C	250,0	3,3	115%
E	312,5	250,0 van D	250,0	-46,8	/
F	156,3	250,0 van E	250,0	-56,8	/
G	78,1	250,0 van F	250,0	-68,0	/
H	39,1	250,0 van G	250,0	-89,3	/
I	Blanco	0,0	250,0	/	/

5.2 ACTN4 concentratiebepaling patiënten-stalen

Een ELISA werd uitgevoerd op de patiënten-stalen van het UZA. Hierbij werd gebruikt gemaakt van 20 stalen en dezelfde Vaglav pool als bij de eerste ELISA. Dit betreft dus: vier stalen van gezonde personen (UZA 44, 47, 54, 62), drie stalen van 'gezonde' patiënten met additionele HPV-infectie (UZA 23, 26, 83), één staal van een 'gezonde' patiënt met een additionele HIV-infectie (UZA 14), één staal van een 'gezonde' patiënt dat gecontamineerd werd met bloed (UZA 81), 6 LSIL-stalen (UZA 61, 79, 86, 88, 90, 101) en 5 HSIL-stalen (UZA 35, 40, 78, 84, 89). De Vaglav-pool werd bij alle ELISA's meegenomen om interindividuele verschillen tussen de verschillende ELISA's te kunnen detecteren. De stalen en de standaard werden allemaal in triplo geanalyseerd en werden blanco gecorrigeerd. De resultaten waren afwijkend van de verwachtingen (resultaten worden niet getoond). Ter controle werd de pH van de stalen gemeten. Deze was bij alle stalen zeer zuur. Dit kan verklaard worden door het gebruik van 5% azijnzuur in het colposcopisch onderzoek om een reversibele coagulatie van eiwitten en cytokeratine te zorgen. Dit maakt het voor de gynaecoloog mogelijk om maligne van gezond weefsel te onderscheiden (Verguts J., 2011). Dit azijnzuur is dus terug te vinden in het CVV van de stalen, verkregen door colposcopie. De pH was erg laag bij alle stalen. Vermoed wordt dat dit een grote invloed heeft op de overschatting van de ACTN4 concentratie. Lage pH (2,0-4,0) kan namelijk voor aggregatie en neerslagvorming zorgen als gevolg van conformatieveranderingen in de structuur van het antilichaam (Wang et al., 2013a). Bovendien zorgen deze conformatieveranderingen, als gevolg van ladingsveranderingen, er meestal voor dat de antigeen-antilichaam binding verstoord wordt. Optimale antigeen-antilichaam binding gebeurt namelijk in de pH range van 6,5-8,4 (Reverberi and Reverberi, 2007). Azijnzuur zorgt dus voor de vorming van antilichaamaggregaten die voor een vals positief resultaat zorgen.

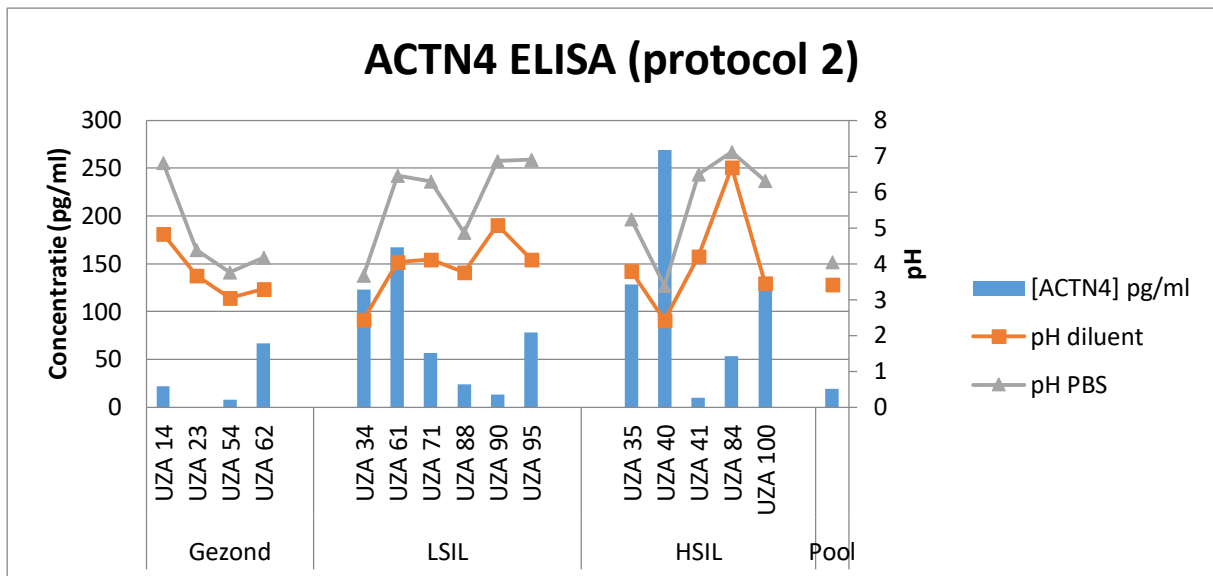
Om de invloed van de pH op de ACTN4 concentratie te verkleinen werden er drie verschillende zelfbedachte protocols uitgewerkt en getest. Deze worden als flowchart weergegeven in figuur 13.

5.2.1 Protocol 1: oplossen in sample diluent

De pH van alle stalen opgelost in *sample diluent* werd gemeten. De stalen, verzameld na lavage bij colposcopie, vertoonden allemaal een lage pH in de range van 2,39 tot 4,60. Hieruit kan men concluderen dat het *sample diluent*, geleverd in de ELISA-kit niet in staat is om azijnzuur te bufferen. Deze kit is geproduceerd voor het gebruik op plasmastalen, die een pH bezitten die meer neutraal is. Dit Protocol gaf geen goede resultaten (niet getoond).

5.2.2 Protocol 2: droogdampen en oplossen in DPBS

Alle patiënten-stalen werden eerst op een totale eiwitconcentratie gebracht van 1mg/ml en verdund met het *sample diluent*, geleverd in de ELISA-kit. Om de pH te doen stijgen moet het azijnzuur verwijderd worden uit het staal. Dit door de stalen volledig droog te dampen met het Savant Speedvac SC100 toestel. Na droogdamping werden de stalen terug opgelost in hetzelfde volume DPBS (Gibco) als het oorspronkelijk toegevoegd volume *sample diluent* om de stalen op de juiste concentratie te brengen. De pH werd opnieuw bepaald. Deze lag bij alle stalen hoger dan de oorspronkelijke gemeten pH (tabel 17 en figuur 11). De ACTN4 ELISA werd vervolgens in triplo bepaald met 100µl staal per well.



Figuur 11. De [ACTN4] (pg/ml) en pH van de stalen gemeten voor protocol 2. Voor de droogdamping waren de stalen verdund in *sample diluent*. Na de droogdamping werden deze terug opgelost in DBPS.

Tabel 17. ACTN4 concentraties en pH bij protocol 2. [ACTN4] (pg/ml) berekend na integratie van absorpties in de vergelijking van de ACTN4 standaard, de gemeten pH voor en na de indamp stap, het toegevoegde buffer volume voor in triplo metingen en de totale eiwitconcentratie ($\mu\text{g/ml}$). Negatieve metingen zijn het gevolg van integratie in de vergelijking en werden gecorrigeerd naar een concentratie van 0 pg/ml.

Status	Staal	[ACTN4] pg/ml	pH diluent	pH PBS	Volume buffer (μl) (in triplo)	[Eiwit] $\mu\text{g/ml}$
Gezond	UZA 14	22,00	4,83	6,82	202,18	3067,00
	UZA 23	0,00	3,67	4,38	256,90	6960,00
	UZA 54	8,00	3,05	3,76	184,53	2598,00
	UZA 62	67,09	3,30	4,18	196,76	2906,00
LSIL	UZA 34	123,15	2,44	3,68	79,93	1363,00
	UZA 61	167,00	4,04	6,45	150,46	2006,00
	UZA 71	56,33	4,12	6,29	11,34	1651,00
	UZA 88	23,67	3,77	4,86	193,32	2812,00
	UZA 90	13,02	5,08	6,87	190,91	2750,00
	UZA 95	78,33	4,12	6,90	86,14	1403,00
HSIL	UZA 35	128,70	3,79	5,25	171,78	2340,00
	UZA 40	269,26	2,43	3,39	153,31	2045,00
	UZA 41	10,31	4,21	6,50	124,23	1707,00
	UZA 84	53,08	6,70	7,12	236,69	4739,00
	UZA 100	135,54	3,46	6,31	54,18	1220,00
	Pool	19,76	3,43	4,05	238,63	4888,00

Ondanks dat de bekomen ACTN4 concentraties al meer in de lijn van de verwachting komt te liggen, is het resultaat nog niet helemaal correct. De pH van bijna alle stalen, behalve UZA 14 (pH 6,82), UZA 61 (pH 6,45), UZA 90 (pH 6,87), UZA 95 (pH 6,90), UZA 41 (pH 6,5) en UZA 84 (pH 7,12), ligt nog onder de range van 6.5-8.4 die waarschijnlijk nodig is voor optimale antigeen-antilichaambinding.

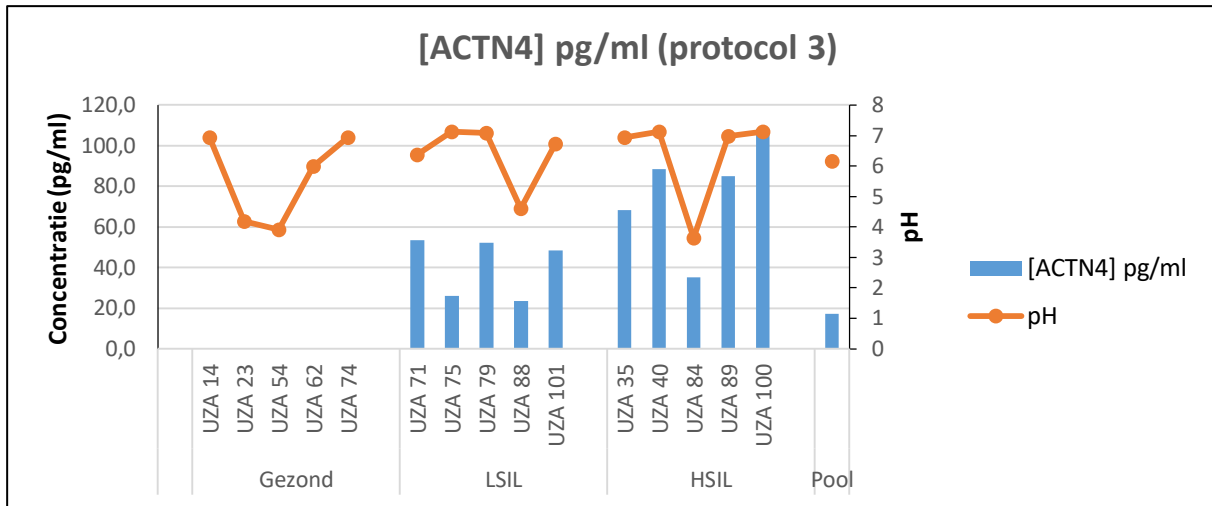
5.2.3 Protocol 3: droogdampen, wassen en oplossen in DPBS

Uit de vorige procedures kan geconcludeerd worden dat het azijnzuur nog niet volledig verdwenen is uit de stalen. De impact op de pH van de stalen en dus ook op de antilichaambinding blijft bijgevolg aanwezig. Bij dit derde protocol werden de stalen eerst volledig drooggedampt om vervolgens twee maal gewassen te worden met 100µl water en terug volledig droog te dampen. Vervolgens werden de stalen terug opgelost in 400µl DPBS buffer. Bij het proces van droogdamping gaat er steeds een fractie van de oorspronkelijke eiwitconcentratie verloren. De hoeveelheid eiwitverlies kan niet exact bepaald worden. Daarom werd van elk staal de eiwitconcentratie opnieuw bepaald d.m.v. een C4-concentratiebepaling. De stalen, met hun nieuwe concentratie, werden verdund om allen met exact dezelfde (1mg/ml) op de ELISA te kunnen laden. De stalen werden verdund in DPBS buffer. Als laatste stap werd de pH opnieuw bepaald. Er werden 16 stalen in triplo geladen met 100µl staal per well: drie stalen van ‘gezonde’ patiënten, één staal van een ‘gezonde’ patiënt met additionele HIV-infectie (UZA 14), één staal van een ‘gezonde’ patiënt met additionele HPV-infectie (UZA 23), vier LSILs, één LSIL met HIV (UZA 71), vijf HSILs en de Vaglav-pool (tabel 18 en figuur 12).

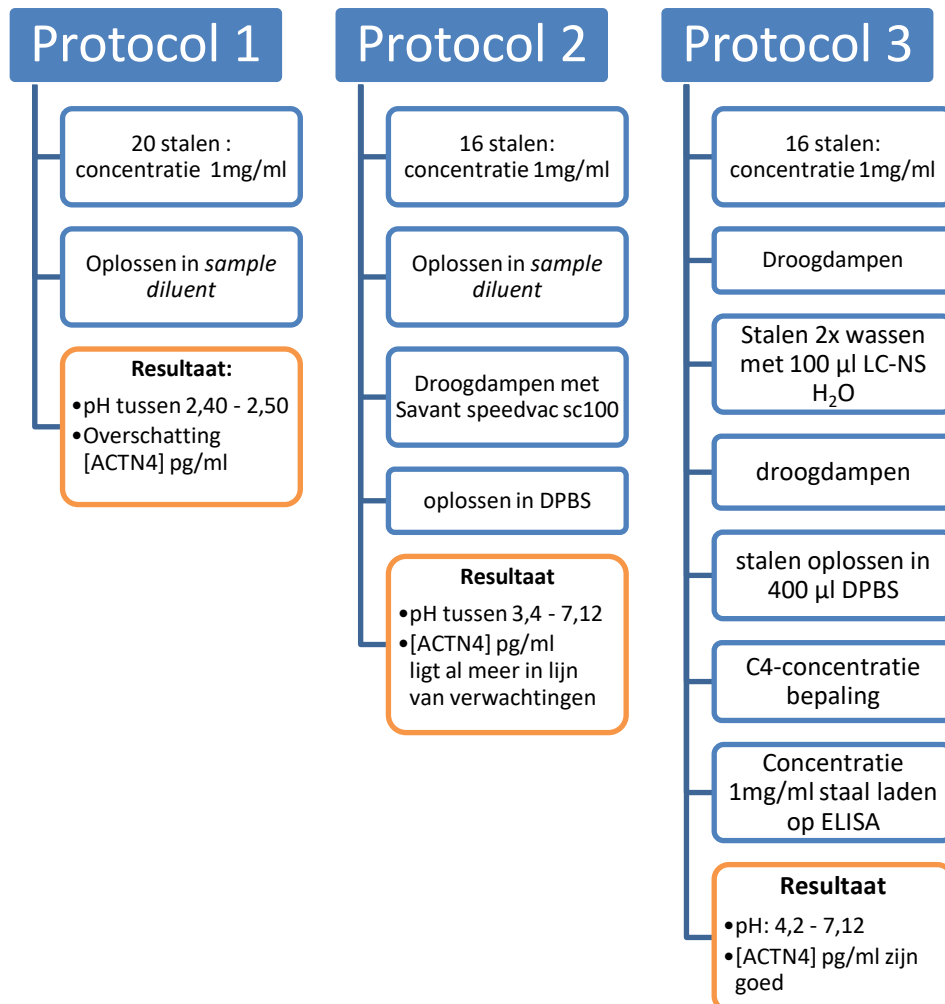
Tabel 18. De ACTN4-concentratie en pH voor protocol 3. De resultaten van de ELISA: de [ACTN4] (pg/ml), de nieuwe eiwitconcentratie (µg/ml) bekomen via C4-HPLC metingen en het toegevoegd volume DPBS (µl) om de stalen te verdunnen. De negatieve concentraties zijn het gevolg van integratie van de gemeten absorpties in de vergelijking van de ACTN4 standaard en werden gecorrigeerd naar nul pg/ml.

Status	Staal	[ACTN4] pg/ml	pH PBS	[Eiwit] µg/ml (na procedure)	Volume PBS (µl) In triplo
Gezond	UZA 14	0,00	6,90	1297,20	80,20
	UZA 23	0,00	4,20	2084,40	182,10
	UZA 54	0,00	3,90	1640,60	136,70
	UZA 62	0,00	6,00	1970,80	172,40
	UZA 74	0,00	6,90	1530,10	121,30
LSIL	UZA 71	53,40	6,40	1354,20	91,50
	UZA 75	25,90	7,10	1856,30	161,50
	UZA 79	52,20	7,10	1706,30	144,90
	UZA 88	23,50	4,60	1622,30	134,30
	UZA 101	48,40	6,70	2196,20	190,60
HSIL	UZA 35	68,40	6,90	1697,20	143,90
	UZA 40	88,40	7,10	2954,870	231,60
	UZA 84	35,10	3,60	1416,70	103,00
	UZA 89	85,10	7,00	1230,40	65,50
	UZA 100	108,40	7,10	2000,00	175,00
	Pool	17,20	6,20	1531,90	121,50

De bekomen resultaten voor dit protocol komen wel overeen met de verwachtingen. Enkel de ACTN4 concentratie voor de stalen van gezonde personen staat nog niet op punt, alle concentraties zijn negatief. Deze werden handmatig gecorrigeerd naar een concentratie van nul pg/mg. De negatieve concentraties kunnen verklaard worden door de integratie van de gemeten absorpties in de vergelijking van de calibratiecurve. Als tweede resultaat zien we dat de LSIL-stalen een lagere ACTN4 concentratie hebben t.o.v. de HSIL-stalen. De *cutoff* voor de ELISA test wordt bepaald bij het onderdeel ‘ROC-curves’ (zie verder). De pH van de meeste stalen ligt na deze procedure in de optimale range van 6,5-8,4. Bij UZA 89 zien we een opmerkelijk lagere ACTN4 concentratie maar de pH van dit staal ligt nog steeds erg laag (pH 3,63) en zou daarom mogelijk voor een vertekend beeld kunnen zorgen. Uit voorgaand onderzoek van Geert Van Raemdonck is namelijk gebleken dat er bij ‘gezonde’ patiënten ook lage concentraties ACTN4 aanwezig zijn in het CVV (Van Raemdonck et al., 2014)



Figuur 12. De ACTN4 concentraties (pg/mg) en pH van de stalen gemeten voor protocol 3. De resultaten van de stalen van ‘gezonde’ patiënten zijn weggelaten gezien een negatieve concentratie niet mogelijk is. De Vaglav-pool is samengesteld uit stalen van ‘gezonde’ patiënten en LSILs.



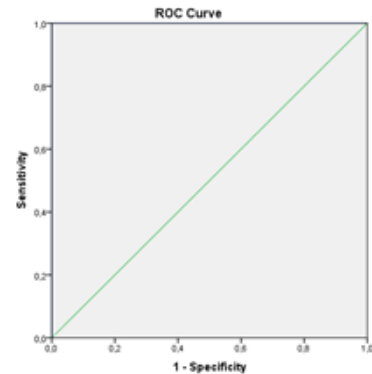
Figuur 13. De flowchart van de drie verschillende protocols. Er werden drie verschillende protocols getest om de pH van de Vaglav-stalen te neutraliseren. Hierdoor zal ook de antigeen-antilichaam binding beter kunnen plaatsvinden in de ELISA.

6 ROC curves ACTN4

Ook voor de ACTN4 resultaten verkregen via ELISA werden ROC-curves opgesteld voor de discriminaties die eveneens getest werden voor de andere biomerkers.

6.1 Onderscheid 1: Gezond versus precancereus (LSIL + HSIL)

Na de optimalisatie van de ELISA-procedure werden de bekomen waarden van drie stalen van gezonde personen, één staal van een 'gezonde' patiënt met additionele HIV-infectie (UZA 14), één staal van een 'gezonde' patiënt met additionele HPV-infectie (UZA 23), vier LSIL-stalen, één LSIL-staal met additionele HIV-infectie (UZA 71), vijf HSIL-stalen en de Vaglav-pool geanalyseerd met een ROC-curve. Als men ACTN4 bekomen volgens protocol 3 (zie 5.2.3) gebruikt voor discriminatie tussen 'gezond' en 'precancereus' (LSIL + HSIL), dan krijgt men een AUC-waarde van één (figuur 14). Dit impliceert dat het onderscheidend vermogen van de biomarker ACTN4 optimaal is en dus zeer goed gezonde patiënten van precancereuze patiënten kan onderscheiden. Immers, de test heeft voor dit onderscheid een sensitiviteit, specificiteit en accuraatheid van 100%. De *cutoff*-waarde om precancereuze- van gezonde personen te discrimineren ligt op een concentratie van 11,9 pg/mg (tabel 19). Deze ligt in dezelfde grootteorde als deze uit het eerder onderzoek van Geert Van Raemdonck waarbij een concentratie van 18pg/mg werd gevonden (Van Raemdonck et al., 2014).



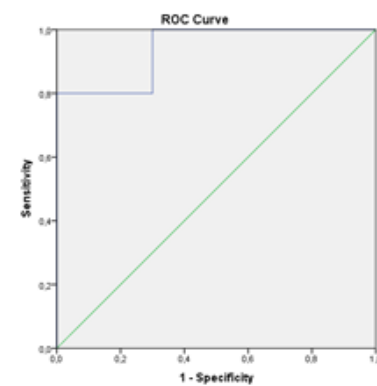
Figuur 14. ACTN4-ROC-curve voor onderscheid 1.

Tabel 19. De AUC-waarde en *cutoff*-waarde van ACTN4 onder de conditie 'gezond' versus precancereus.

EWIT	AUC-waarde: Gezond / Precancereus (LSIL + HSIL)	Std, Error	Cutoff (pg/mg)	Sensitiviteit (%)	specificiteit (%)
ACTN4	1,00	0,00	11,90	100,00	100,00

6.2 Onderscheid 2: niet-risico-/ risicovol voor HSIL ('gezond'+LSIL/ HSIL)

De capaciteit van ACTN4 voor discriminatie tussen gezond + LSIL enerzijds en HSIL anderzijds werd getest op dezelfde ELISA resultaten als bij de vorige onderscheidende conditie ('precancereus'/'ziek'). De *cutoff*-waarde ligt nu op 60,9 pg/mg om HSIL-stalen van de andere stalen (gezond + LSIL) te kunnen onderscheiden. De AUC-waarde is 0,94 en is dus zeker nog hoog genoeg om ACTN4 te kunnen gebruiken als diagnostische biomarker voor deze onderscheidende conditie (tabel 20 en figuur 15). Men kan proberen een tweede biomarker te combineren met ACTN4 om ook hier een totale AUC-waarde van 1 te krijgen en dus een sensitiviteit en specificiteit van 100%. Dit zal verder besproken worden in de discussie.



Figuur 15. ACTN4-ROC-curve voor onderscheid 2.

Tabel 20. De AUC-waarde en *cutoff*-waarde van ACTN4 voor het onderscheid tussen niet risico- en risicovol voor HSIL.

EWIT	AUC-waarde: Gezond / Ziek(LSIL + HSIL)	Std, Error	Cutoff (pg/mg)	Sensitiviteit (%)	specificiteit (%)
ACTN4	0,94	0,06	60,9	80,00	70,00

Discussie

1 Optimalisatie isotopisch gelabelde proteotypische peptiden

Onder ideale omstandigheden worden er van elk eiwit minstens twee PTPs geanalyseerd en minstens vijf fragmenten geselecteerd voor de Multiplex-analyse. Hierdoor zal de sensitiviteit voor het meten van een bepaald peptide stijgen. Bovendien, door twee PTPs te selecteren in plaats van één zal kwantificatie van een bepaald eiwit in een complex staal correcte verlopen. Toch zijn er enkele eiwitten waarvan na het optimalisatieproces maar één proteotypisch peptide is opgenomen in de finale multiplex analyse, namelijk: Cathepsine B (CC14_1), 14-3-3 proteïne epsilon (CC08_1), en PSME1. De andere peptiden van deze eiwitten gaven tijdens de optimalisatie enkel een goed signaal in de eerste verdunning (0,1pg/ml). Door dit laag signaal zou men de patiënten stalen te sterk voor dit peptide moeten spiken indien men het nog wil detecteren tijdens de finale Multiplex-analyse. Een moeilijke ionisatie van deze peptiden kan een mogelijke verklaring zijn voor de slechte optimalisatie, met als gevolg de exclusie van deze peptiden uit de finale Mutiplex-analyse. De ionisatiegraad werd echter al bepaald bij de 550 fysico-chemische eigenschappen waarvoor het ESP Predictor programma screent tijdens de berekening van de ESP-scores (zie materiaal en methode).

Tabel 21. ESP Predictor. De ESP-scores van de geoptimaliseerde PTPs berekend met ESP Predictor.

EIWIT	BM	SEQUENTIE	ESP-SCORE
CATHEPSINE B	CC14_1	GQDHCGIESEVVAGIPR	0,73
	CC14_2	EQWPQCPTIK	0,45
14-3-3 proteïne epsilon	CC08_1	EAAENSLVAYK	0,84
	CC08_2	VAGMDVELTVEER	0,70

Men kan duidelijk zien dat de ESP-score van CC14_2 veel lager ligt dan deze van CC14_1. Het peptide scoort dus minder goed op de verschillende fysio-chemische eigenschappen waarop de peptiden worden gescreend door het ESP Predictor programma. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor de slechte optimalisatie van CC14_2. Nochtans werden enkel de twee PTPs met de hoogste ESP-score geselecteerd om te gebruiken in het multiplex experiment. Bij de peptiden van 14-3-3 proteïne epsilon liggen de scores van beide PTPs niet zo ver uit elkaar. De oorzaak voor de slechte optimalisatie moet daar eerder gezocht worden bij de instellingen van het Xevo toestel tijdens de optimalisatieprocedure van de PTPs. Omdat we zoveel mogelijk PTPs wilden optimaliseren om voor zoveel mogelijk eiwitten te kunnen screenen werd er enkel geoptimaliseerd voor de concentratie en de collisie-energie. Er zijn echter nog verschillende andere parameters zoals capillair voltage, cone voltage, temperatuur, gas flow,... die een rol spelen bij de ionisatie van proteotypische peptiden. Wegens tijdsbeperking werden deze parameters voor alle peptiden standaard als volgt ingesteld: capillair voltage van 25kV, cone voltage van 50V en temperatuur van de probe op 500 °C. Als men deze instellingen ook zou optimaliseren per peptide zou het lage signaal mogelijks nog kunnen verbeteren, maar dan zou er wel voor elk peptide een afzonderlijke analyse uitgevoerd moeten worden omdat deze parameters dan voor elk peptide anders zijn ingesteld.

De sensitiviteit voor de detectie van een bepaald peptide speelt ook een rol. Hoe meer fragmenten van een peptide men includeert in de Multiplex-analyse, hoe hoger de sensitiviteit gemeten voor dat peptide. Bij de optimalisatie werden er soms minder fragmenten geselecteerd voor de MRM-detectie in plaats van het vooraf vast gestelde aantal van minstens vijf. Dit kan het gevolg zijn van de moeilijke fragmentatie van een bepaald precursor-ion door een verkeerde collisie-energie. Als de collisie-energie te laag is, kan het zijn dat het precursor-ion zelf nog een te hoog signaal geeft en niet genoeg is gefragmenteerd. Als de collisie-energie te hoog is kan het zijn dat het precursor-ion te sterk fragmenteert waardoor men slechts signaal krijgt van alleen aminozuren. Een enkel AZ selecteren als fragment voor de detectie is daarbij geen goede keuze omdat dit AZ niet specifiek, uniek is voor dat peptide. De fragmenten die geselecteerd worden moeten dus voldoende groot zijn.

2 Data analyse multiplex-experiment op patiënten-stalen

Tijdens de data-analyse van het multiplex-experiment werd een opvallend groot verschil in concentratie gevonden tussen de twee PTPs van hetzelfde eiwit in hetzelfde patiënten staal. Dit kan ook te verklaren zijn door de moeilijke ionisatie van het peptide of omdat de andere parameters zoals capillair voltage, cone voltage en temperatuur op standaardwaarden ingesteld waren en door tijdsgebrek niet geoptimaliseerd werden. Ook de fixatietijd van sommige peptiden was niet helemaal correct ingesteld waardoor de resultaten van deze peptiden ontbreken (CC29_2) of verkeerd geïnterpreteerd kunnen worden. In de toekomst kan men deze verschillende parameters verder optimaliseren voor een selectie van goede biomarkers.

Zoals uitgelegd bij de resultaten werd er getracht de absolute concentratie in pg/mg te bepalen van elk staal. Deze concentratie is mogelijk niet helemaal correct omdat de synthetische peptiden pas na het trypsiniseren toegevoegd worden. Bovendien dient eerst een ijklijn te worden opgesteld om een lineair verband tussen verschillende concentraties van de peptiden voor hetzelfde eiwit aan te tonen. Als de trypsinisatie van de endogene, niet gelabelde peptiden uit de patiënten stalen maar voor de helft succesvol was, dan meten we in MRM een lagere concentratieverhouding tussen de endogene proteotypische peptiden en de isotopisch gelabelde proteotypische peptiden dan wanneer de trypsinisatie optimaal plaats vond. Dit zou voorkomen kunnen worden door isotopisch gelabelde eiwitten te bestellen en deze te trypsiniseren met hetzelfde trypsinisatie-protocol dat gebruikt werd bij de patiënten stalen om zo het isotopisch gelabeld peptide te genereren. Vermits alle stalen hetzelfde trypsinisatie proces ondergaan, gaan we er van uit dat de stalen dan onderling vergelijkbaar zijn op basis van de waarden die we meten. Uit onderzoek in de literatuur blijkt dat men bezig is met de ontwikkeling van een methode die gebruik maakt van *in vitro* gesynthetiseerde isotoop-gelabelde full-length eiwitten die kunnen dienen als standaard voor absolute kwantificatie in complexe stalen (Brun et al., 2007). Door gebruik te maken van deze gelabelde eiwitten heb je wel minder controle over de uiteindelijke concentratie van de gelabelde peptiden. Echter, je weet nu wel hoeveel isotopisch gelabeld peptide je exact hebt toegevoegd aan de stalen.

3 ROC-curves multiplex-experiment op patiënten stalen

3.1 Onderscheid 1: 'Gezond' versus precancereus (LSIL + HSIL)

Een eiwit met een AUC-waarde onder 0,70 is absoluut niet geschikt om gebruikt te worden in een diagnostisch assay, zelfs niet in combinatie met ACTN4. De meeste geteste eiwitten hebben een AUC-waarde onder 0,65 (tabel 14) en kunnen niet gebruikt worden om een correct onderscheid te maken tussen een gezonde of een precancereuze patiënt. Er zijn echter drie peptiden die wel goed scoren voor deze onderscheidende conditie, namelijk CC12_1 (Angiotensinogeen), CC30_1 (Lactaat Dehydrogenase A) en MIF_2 (MIF) (tabel 22).

Tabel 22. Goede kandidaat biomarkers onderscheid 1. De *cutoff* waarde geeft weer bij welke concentratie in pg/mg eiwit gezonde personen van precancereuze onderscheiden worden. CC12_1, CC30_1 en MIF zijn op basis van hun AUC-waarde veelbelovende peptiden om een correcte diagnose te kunnen stellen. De beschreven sensitiviteit en specificiteit zijn diegene die bij de *cutoff*-waarde horen.

EIWIT	BM	AUC-waarde: gezond/ precancereus (LSIL + HSIL)	Std. Error	Cutoff- waarde (pg/mg)	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)
ANGIOTENSINOGEEN	CC12_1	0,83	0,08	4185,27	73,33	83,30
	CC12_2	0,53	0,13	2080,68	64,29	70,00
LDHA	CC30_1	0,81	0,11	3109,06	62,50	85,70
	CC30_2	0,57	0,11	48268,10	52,94	66,70
MIF	MIF_1	/	/	/	/	/
	MIF_2	0,83	0,09	1853,48	85,70	31,20

3.1.1 Angiotensinogeen als potentiële biomarker voor onderscheid 1

Van Angiotensine II, waarvoor Angiotensinogeen de precursor is, werd al aangetoond dat het een effect heeft op de progressie van een cervixtumor omdat het de secretie van VEGF induceert door de Angiotensine II type I receptor. Dit resulteert in een stijging van invasiviteit van de tumorcellen. Deze resultaten zijn gebaseerd op weefselstudies (Kikkawa et al., 2004a). Gebaseerd op de *cutoff*-waarde uit de ROC curve kan dit resultaat terug gevonden worden binnen de eigen dataset. Er zijn echter 5/17 precancereuze stalen die vals negatief zouden scoren bij deze gegeven *cutoff*-waarde. Dit kan de daling in sensitiviteit tot 73,3% verklaren. De specificiteit scoort met 83,3% zeer hoog. Desondanks kan Angiotensinogeen een onderscheid maken tussen gezonde en precancereuze patiënten. We moeten echter voorzichtig zijn met deze conclusie omdat het PTP waarop is gebaseerd in vele stalen niet terug te vinden was. Angiotensinogeen is wel een belangrijk eiwit omdat het mogelijk centraal ligt in een intracellulair interactie netwerk van kankereiwitten die in CVV worden teruggevonden (Van Ostade et al., 2014).

3.1.2 LDHA als potentiële biomarker voor onderscheid 1

De literatuur leert ons dat er een verhoogde expressie van LDHA is bij gynaecologische kankers ten opzichte van gezond weefsel en dat een hoge LDHA concentratie een verminderde kans op 5-jaar overleving geeft (Koukourakis et al., 2009). Deze resultaten zijn gebaseerd op cellijn experimenten (Huang et al., 2011a). Gebaseerd op de *cutoff*-waarde berekend uit onze eigen resultaten kan bevestigd worden dat LDHA geschikt is om gezonde van precancereuze patiënten te onderscheiden. De sensitiviteit voor deze merker ligt echter laag: 62,5% (tabel 22). Deze lage sensitiviteit kan er voor zorgen dat er veel vals negatieve diagnoses gesteld zullen worden. Dit kan inderdaad nadelig zijn voor de 5-jaar overlevingskans als een patiënte met een HSIL letsel gemist wordt. Verdere optimalisatie van dit peptide voor LDHA is noodzakelijk en zou deze resultaten in de toekomst kunnen verbeteren. Een tweede resultaat dat opvalt is dat de concentraties van LDHA uitgedrukt in pg/mg in de verschillende stalen beduidend hoger liggen dan de concentraties van de andere peptiden in diezelfde stalen. Een mogelijke verklaring hiervoor is de rol van LDHA in het energiemetabolisme van een cel. Het enzyme katalyseert namelijk de laatste stap van de anaerobe glycolytische pathway die geprefereerd wordt door kankercellen en zorgt voor de omzetting van pyruvaat en NADH tot lactaat en NAD⁺ zorgt (Fan et al., 2011).

3.1.3 MIF als potentiële biomarker voor onderscheid 1

“Bij een persoon met baarmoederhalskanker zal MIF een toegenomen expressie vertonen, terwijl deze expressie bij een gezonde persoon laag tot afwezig zal zijn” (Krockenberger et al., 2010). Deze eerste stelling werd terug gevonden in de literatuur en is gebaseerd op resultaten van cervixkankercellijnen. Als men kijkt naar de berekende *cutoff*-waarde en sensitiviteit en specificiteit ziet men dat die laatste erg laag ligt: 31,3%. Dit wil zeggen dat er, gebaseerd op deze *cutoff*-waarde van 1853,5 pg/mg, veel vals positieve patiënten gediagnosticeerd zullen worden. Men zal op basis van deze merker alleen patiënten gaan overbehandelen. Omwille van de hoge sensitiviteit zullen er echter weinig precancereuze patiënten gemist worden bij de diagnosestelling. Op basis van deze resultaten kan men toch besluiten dat MIF een goede biomarker is om precancereuze patiënten van gezonde te kunnen onderscheiden, maar dat de analyse weinig betrouwbaar is omdat deze resultaten gebaseerd zijn op een enkel peptide. Optimalisatie van een tweede peptide voor MIF kan deze resultaten in de toekomst bevestigen.

3.2 Onderscheid 2: niet risico- en risicovol voor HSIL (gezond+LSIL/HSIL)

Patiënten met een high-risk-HPV infectie die is omgevormd tot een LSIL-letsel hebben namelijk nog steeds 80% kans dat het immuunsysteem de infectie en het letsel zal klaren. Patiënten met een HSIL-letsel hebben meer kans dat hun letsel evolueert naar een invasief carcinoom. Daarom is het testen van de verschillende biomerkers onder deze conditie een meerwaarde voor het onderzoek.

De meeste geteste eiwitten hebben met beide peptiden een AUC-waarde onder 0,65 en kunnen dus niet gebruikt worden om een patiënt met een verhoogd risico op een invasief cervixcarcinoom te onderscheiden van de rest (tabel 15). Bovendien moet de *cutoff*-waarde voor dit onderscheid boven de *cutoff*-waarde van het eerste onderscheid (gezond/precancereus) liggen, omdat men verwacht dat de concentratie van het peptide toeneemt naarmate het letsel evolueert tot een invasief carcinoom. Er zijn echter twee peptiden die wel goed scoren voor onderscheid 2, namelijk CC1_1 (Gelsoline) en CC08_1 (14-3-3 proteïne epsilon). CC12_1 (Angiotensinogeen) en MIF_2 (MIF) blijven ook onder deze conditie goed scoren. De andere peptiden van deze eiwitten scoren veel lager en kunnen niet gebruikt worden om een diagnose te stellen. De verklaring voor het verschil in concentratie tussen de twee PTPs van één eiwit is weer te vinden bij het moeilijk ioniseren van een van de peptiden of de extra parameters die beter geoptimaliseerd moeten worden (tabel 23).

Tabel 23. Goede kandidaat biomerkers onderscheid 2. Er werden ROC-curves opgesteld om te kijken hoe goed een bepaald peptide HSIL-stalen van de rest kan onderscheiden. De *cutoff* waarde geeft weer bij welke concentratie in pg/mg eiwit dat is. CC12_1, CC18_1, CC08_1 en MIF_1 zijn op basis van hun AUC-waarde veelbelovende peptiden om een correcte diagnose te kunnen stellen.

EIWIT	BM	AUC-waarde: gezond+LSIL/HSIL	Std. Error	Cutoff-waarde (pg/mg)	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)
ANGIOTENSINOGEEN	CC12_1	0,79	0,09	5381,06	83,33	63,60
	CC12_2	0,54	0,16	2905,77	60,00	68,40
MIF	MIF_1	/	/	/	/	/
	MIF_2	0,90	0,02	5799,59	80,00	59,30
GELSOLINE	CC18_1	0,82	0,09	6744,26	66,67	82,60
	CC18_2	0,53	0,13	3617,27	42,86	66,70
14-3-3 Proteïne-ε	CC08_1	0,86	0,71	3748,80	83,30	78,30

3.2.1 Angiotensinogeen als potentiële biomarker voor onderscheid 2

De *cutoff*-waarde van deze onderscheidende conditie (5381,1 pg/mg) ligt boven die van conditie 1 (4185,3 pg/mg), wat noodzakelijk is om de HSIL stalen te kunnen onderscheiden van de rest. Angiotensinogeen zou gebaseerd op de *cutoff*-waarde een goede biomarker kunnen zijn om HSILs te kunnen onderscheiden. Ook de hoge sensitiviteit (83,3%) bij deze *cutoff*-waarde is goed omdat men zo weinig mogelijk vals negatieve diagnoses wil stellen. Een HSIL-diagnose missen kan op termijn ernstige gevolgen hebben op de gezondheid van de patiënte. De lagere specificiteit (63,6%) is in dit geval niet zo erg. De analyse is echter weinig betrouwbaar omdat de resultaten gebaseerd zijn op een enkel PTP. Verder finetunen van de ionisatie instellingen van het tweede PTP (CC12_2) is daarom noodzakelijk om deze resultaten in de toekomst te bevestigen.

3.2.2 MIF als potentiële biomarker voor onderscheid 2

De expressie van MIF zal toenemen naarmate het ontwikkelingsproces van kanker vordert (Krockenberger et al., 2010). Gebaseerd op de *cutoff*-waarde van onze ROC curve kan dit resultaat bevestigd worden voor CVV stalen (tabel 23). Ook de hoge sensitiviteit (80%) bij deze *cutoff*-waarde is goed omdat men zo weinig mogelijk vals negatieve diagnoses wil stellen. Bovendien ligt de *cutoff*-waarde van dit onderscheid (5799,6 pg/mg) boven die van onderscheid 1 (1853,5 pg/mg). MIF zou een goede biomarker kunnen zijn om HSILs te kunnen discrimineren maar de analyse is ook hier weer weinig betrouwbaar omdat de resultaten gebaseerd zijn op een enkel PTP. Optimalisatie van een tweede peptide zou deze resultaten in de toekomst eventueel kunnen bevestigen.

3.2.3 Gelsoline als potentiële biomarker voor onderscheid 2

Uit de literatuur komt naar voor dat Gelsoline levels bij 78% van de cervixkankerpatiënten is opgereguleerd en dat deze levels ook 2.2x hoger zijn t.o.v. gezonde controlepersonen. Op basis van de gemeten concentraties (pg/mg) uit onze resultaten kan deze stelling niet worden bevestigd. Dit kan verklaard worden omdat de resultaten uit de literatuur gebaseerd zijn op cervixtumoren en in onze studie gewerkt wordt met HSIL-stalen. Over het expressieverschil in voorstadia van cervixkanker wordt in de literatuur niets vermeld. Ook omdat er maar één PTP goed geoptimaliseerd werd voor deze merker en er nog maar weinig is geweten over de rol van Gelsoline in de voorstadia van cervixkanker is de merker misschien niet goed genoeg om verder onderzoek op uit te voeren. Er was wel een verhoging van *cutoff*-waarde terug te vinden ten opzichte van het eerste onderscheid ('geзд'/'precancerous'). Bovendien ligt de sensitiviteit van de merker bij deze *cutoff*-waarde op 66,7%. Deze sensitiviteit is al redelijk risicovol om te gebruiken wanneer men HSILs wil kunnen onderscheiden van de rest. Diagnose gebaseerd op basis van dit peptide zou vals negatieve resultaten kunnen zorgen.

3.2.4 14-3-3 proteïne epsilon als potentiële biomarker voor onderscheid 2

De literatuur leert ons dat de familie van 14-3-3 eiwitten een rol spelen bij de carcinogenese en een sleutelrol hebben in de beslissing van een cel om te kiezen voor proliferatie of voor celdood (Higareda-Almaraz et al., 2011). Gebaseerd op de concentraties van dit peptide in de verschillende stalen, de *cutoff*-waarde en de goede AUC-waarde van de ROC-curve is dit eiwit zeker de moeite waard om verder te onderzoeken. Bovendien is de bekomen sensitiviteit (83,3%) en specificiteit (78,3%) voor dit peptide bij deze *cutoff*-waarde wel goed. Het is wel jammer dat hiervoor ook maar één PTP geoptimaliseerd kon worden. Voor bevestiging van deze bevindingen moet er in de toekomst een tweede PTP geoptimaliseerd worden.

3.3 Onderscheid 3: invloed van HIV

Er werden drie stalen met HIV getest: één gezond staal met HIV (UZA 14) en twee LSIL-stalen met HIV. Uit de resultaten (bijlage 4) leek Cathepsine B interessant omdat het in zeer hoge concentraties (pg/mg) aanwezig was in de stalen met additionele HIV-infectie en in veel lagere concentraties terug te vinden was in de andere stalen. Er zijn echter te weinig HIV-stalen getest en de resultaten van Cathepsine B zijn ook niet optimaal, aangezien er is namelijk maar één PTP getest werd dat bij de meeste stalen zelfs geen signaal gaf. Uit voorgaand onderzoek van het labo is trouwens gebleken dat Cathepsine B is verhoogd in patiënten die HIV-resistent zijn en dus niet in HIV-geïnfecteerde patiënten. Ook dit zorgt voor een tegenstrijdig resultaat (Van et al., 2014)

4 ACTN4 ELISA

ACTN4 kan gekwantificeerd worden door middel van een ELISA vanwege de hoge sensitiviteit en specificiteit van deze test. Bij een ELISA-test bestaat echter wel het risico dat de antilichamen aspecifiek gaan reageren met andere eiwitten in een complex staal (Makawita and Diamandis, 2010). Bovendien is binnen deze onderzoeksgroep al aangetoond dat ELISA op stalen van het CVV in slechts 20% van de gevallen succesvol is (Valkenburg N. and Van Ostade X., 2014a), daarom was er nood aan een procedure waarbij de ACTN4 concentratiebepaling via ELISA werd geoptimaliseerd. Er waren hierbij enkele problemen: om te beginnen werd de ELISA kit van Cusabio normaal enkel gebruikt voor ACTN4 concentratiebepaling op serumstalen. Het grote verschil tussen serumstalen en cervicovaginale lavages is de pH van de stalen. De normale pH van serumstalen ligt tussen 7,35 en 7,45 terwijl de pH van onze gemeten CVV stalen tussen 2,39 en 4,60 schommelt (Tietz, 2006). De lage pH van de CVV stalen kon enerzijds verklaard worden door de aanwezigheid van 5% azijnzuur die in het colposcopisch onderzoek wordt gebruikt om voor een reversibele coagulatie van eiwitten en cytokeratine te zorgen waardoor premaligne en maligne epitheel in de baarmoederhals wit zal aankleuren. (Verguts J., 2011). Dit azijnzuur is dus terug te vinden in het CVV van de stalen, verkregen door colposcopie. Anderzijds ligt de pH van baarmoederhalslijmvlies sowieso al lager, namelijk onder pH 4,5, omdat het slijmvlies een belangrijke immunologische verdediging barrière is tegen micro-organismen (Cole, 2006b). Maar een lage pH (2,0-4,0) heeft een grote invloed op de antigeen-antilichaam binding die belangrijk is bij ELISA analyses. Wanneer de pH te laag is zorgt dit voor aggregatie en neerslagvorming waardoor er een ACTN4-antilichaamkluw zou ontstaan dat na toevoeging van het TMB-substraat voor een zeer intense kleuromzetting kan zorgen. Deze kluwen zijn de oorzaak van de overschatting van de ACTN4 concentratie bekomen in de resultaten, optimale antigeen-antilichaam binding gebeurt immers bij een pH van 6,5-8,4 (Reverberi and Reverberi, 2007). Te lage pH kan er ook voor zorgen dat er conformatieveranderingen in de structuur van het antilichaam kunnen optreden die correcte antigeen-antilichaambinding verhindert (Wang et al., 2013b).

Voor een optimaal gebruik van de ELISA kit van Cusabio moest de pH dus aangepast van 3,39-4,60 naar 6,5-8,4. Drie zelf opgestelde protocols werden hiervoor getest en vergeleken. Protocol 1: stalen oplossen in sample diluent, geleverd in de ELISA-kit. Protocol 2: Stalen oplossen in sample diluent, geleverd in de ELISA-kit, stalen volledig droogdampen met de Savant Speedvac SC100 en weer oplossen in DPBS. Protocol 3: Stalen volledig droogdampen met de Savant Speedvac SC100. Dan stalen twee maal wassen met 100µl LC-MS H₂O en terug droogdampen. Vervolgens stalen oplossen in 400µl DPBS en concentratie bepalen met C4-HPLC methode. Tenslotte stalen naar totale eiwitconcentratie van 1mg/ml brengen. De flowchart van alle protocols is terug te vinden bij de resultaten (figuur 13).

Uit de vergelijking van de drie protocols kan men besluiten dat:

1. Het sample diluent geleverd bij de ELISA kit niet in staat is de pH van de vaglav-stalen te bufferen (Protocol 1)
2. Het sample diluent na droogdamping van de stalen te vervangen door DPBS-buffer de pH doet stijgen maar niet al het azijnzuur verwijdert (Protocol 2)
3. Droogdamping van de stalen gevolgd door twee wasstappen met LC-MS water gecombineerd met de vervanging van het sample diluent door DPBS-buffer de pH binnen de correcte range brengt (Protocol 3)

Protocol 3 geeft zeer goede resultaten voor de ACTN4 concentratie en de pH valt bovendien bij zo goed als alle geteste stalen binnen de optimale pH range van 6,5-8,4. Toch werkt deze methode nog niet perfect aangezien er nog een paar van de geteste stalen een te lage pH hebben. Een derde wasstap met LC-MS water zou dit misschien kunnen verhelpen. Een groot nadeel van protocol drie is dat het qua voorbereiding wel het langst duurt. Toch kan er besloten worden dat protocol drie van de drie geteste protocols de beste resultaten geeft en in de toekomst zeker gebruikt kan worden om de pH van de Vaglav-stalen te optimaliseren.

5 ROC-curves ACTN4

5.1 Onderscheid 1: 'gezond' versus 'precancereus' (LSIL + HSIL)

Uit voorgaand onderzoek werd aangetoond dat ACTN4 een sensitiviteit en specificiteit had van 86% om precancereuze patiënten correct van 'gezonde' patiënten te kunnen onderscheiden (Van Ostade et al., submitted). Deze sensitiviteit- en specificiteitwaarden zijn hoog voor één biomerker, maar zijn niet voldoende om een diagnostisch assay op de stellen. De sensitiviteit en specificiteit moet hiervoor minstens 95% zijn (Saah and Hoover, 1998). Echter, na het op punt stellen van de optimalisatieprocedure voor de ACTN4 ELISA door de neutralisatie van de pH (protocol 3, zie resultaten), zag men dat de sensitiviteit en specificiteit gestegen waren tot 100%. Hieruit zou men kunnen concluderen dat ACTN4 op zichzelf een goede biomerker is voor de voorwaarden gesteld in het eerste onderscheid: precancereus/gezond. Dit moet wel nog verder gevalideerd worden omdat de ACTN4 ELISA in dit werk getest werd op slechts 16 stalen. Deze steekproef is te klein om definitieve conclusies te trekken, maar de resultaten op deze kleine groep stalen waren in ieder geval hoopvol. Wel was de ACTN4 concentratie in de stalen van 'gezonde' patiënten te laag om correct gedetecteerd te worden. Alle concentraties waren immers negatief, een gevolg van integratie van de gemeten absorpties in de vergelijking van de calibratiecurve. In voorgaand onderzoek van het labo werd nochtans aangetoond dat ook in stalen van 'gezonde' patiënten een kleine hoeveelheid ACTN4 terug te vinden was. Ten slotte werd de *cutoff*-waarde berekend op basis van de opgestelde ROC-curve. Deze was 12pg/mg en lag dicht tegen de *cutoff*-waarde van 18pg/mg berekend in voorgaand onderzoek (Van Raemdonck et al., 2014).

5.2 Onderscheid 2: niet risico- en risicovol voor HSIL ('gezond'+LSIL/HSIL)

Gebaseerd op de ROC-curve kregen we een accuraatheid van 94% om d.m.v. ACTN4 HSIL-stalen te kunnen onderscheiden van gezonde of LSIL-stalen. Ook hier kan men weer concluderen dat ACTN4 op zichzelf een goede diagnostische merker is om niet risico- en risicovolle patiënten van elkaar te kunnen onderscheiden. Maar zoals hoger vermeld moet men dezelfde opmerking maken dat er te weinig stalen getest werden om definitieve conclusies te trekken. De *cutoff*-waarde voor dit onderscheid ligt op 41,71 pg/mg en ligt dus zoals verwacht boven de *cutoff*-waarde van het eerste onderscheid. Dit is de eerste maal dat werd aangetoond dat ACTN4 het onderscheid kan maken tussen hoge (HSIL) en lage (LSIL) intra-epitheliale laesies.

Omdat de accuraatheid van ACTN4 voor het tweede onderscheid op 94% ligt en deze voor het gebruik van een biomerker in een diagnostisch assay minstens op 95% moet liggen, kan er gekeken worden naar combinaties van ACTN4 met andere goed scorende biomerkers voor dit onderscheid. Uit de analyses van de ROC-curves gebaseerd op de resultaten van het multiplex experiment, kwamen Angiotensinogeen, MIF, Gelsoline en 14-3-3 proteïne epsilon naar voor als kandidaat biomerkers voor deze combinatie met ACTN4. Dit heeft een invloed op de correcte identificatie en concentratiebepaling van deze peptiden in een complex staal. Omdat 14-3-3 proteïne epsilon het hoogst scoorde van deze vier eiwitten (86%), werd er getracht een combinatie van beide merkers te maken voor de overeenkomstige stalen. De twee *cutoff*-waarden, die van ACTN4 en die van 14-3-3 proteïne epsilon werden in de analyse opgenomen. De voorwaarde voor een goede combinatie assay wordt ingesteld op: minstens één van de twee eiwitten moet boven de discriminerende *cutoff*-waarde liggen bij HSIL-stalen (tabel 24).

Tabel 24. Mogelijk combinatie assay voor onderscheid 2. Er werd een mogelijk combinatie assay opgesteld met ACTN4 en 14-3-3 Proteïne epsilon. De voorwaarde voor een goede combinatie assay wordt ingesteld op: 'minstens één van de twee eiwitten moet boven de discriminerende cutoff-waarde liggen bij HSIL-stalen'.

STATUS	UZA STAAL	[ACTN4] pg/mg	Cutoff-waarde ACTN4 (41,71 pg/mg)	Cutoff-waarde 14-3-3- P-ε (3748,80 pg/mg)	[14-3-3 P-ε] pg/mg
GEZOND	UZA 14	0,00	Nee	Nee	1147,18
	UZA 23	0,00	Nee	Nee	1144,16
	UZA 54	0,00	Nee	Nee	1043,94
	UZA 62	0,00	Nee	Nee	476,05
	UZA 74	0,00	Nee	Nee	1512,89
LSIL	UZA 71	53,92	Ja	Nee	1772,98
	UZA 75	25,92	Nee	Nee	539,46
	UZA 79	52,17	Ja	Nee	912,55
	UZA 88	23,42	Nee	Ja	9300,60
	UZA 101	48,42	Ja	Nee	13,00
HSIL	UZA 35	68,42	Ja	/	/
	UZA 40	88,42	Ja	Ja	3878,98
	UZA 84	35,08	Nee	Ja	4699,00
	UZA 89	85,08	Ja	Ja	59789,54
	UZA 100	108,42	ja	nee	2930,45

De opgestelde voorwaarden zijn voor alle geteste stalen voldaan. De concentraties van gezonde- en LSIL-stalen moest minstens onder één van de twee *cutoff*-waarden liggen en de concentratie van HSIL-stalen moest minstens boven één van de twee *cutoff*-waarden liggen. Door ACTN4 en 14-3-3 proteïne epsilon met elkaar te combineren bekomen we een diagnostische assay met een sensitiviteit en specificiteit van 100%. Hoewel dit resultaat veelbelovend is, is verder onderzoek absoluut noodzakelijk omwille van de kleine steekproefgrootte. Optimalisatie van minstens een tweede PTP voor 14-3-3 proteïne epsilon is eveneens noodzakelijk.

Conclusie en toekomstperspectieven

Er werd in deze thesis getracht eiwitten te vinden die, mogelijks in combinatie met ACTN4, de sensitiviteit en specificiteit van een diagnostisch assay voor baarmoederhalskanker kon doen stijgen. Er werd naar biomerkers gezocht die discriminerend konden zijn voor ‘gezonde’ en precancereuze patiënten (onderscheid 1) of voor niet risico- en risicovolle patiënten bij HSIL (onderscheid 2). Voor onderscheid 1 werden er drie eiwitten gevonden, namelijk: Angiotensinogeen, Lactaat Dehydrogenase A en macrofaag migratie inhibitie factor. De sensitiviteit, specificiteit en accuraatheid van deze kandidaat biomerkers op zichzelf zijn niet voldoende om een diagnostisch assay te kunnen opstellen omdat deze minstens 95% moeten bedragen.

Voor onderscheid 2 tussen risicovolle en minder risicovolle patiënten werden er drie goede kandidaat biomerkers gevonden die deze discriminatie kunnen maken. De biomerkers zijn Angiotensinogeen, MIF en 14-3-3 proteïne epsilon. Ook hier kan geconcludeerd worden dat deze merkers op zichzelf niet voldoende sensitief specifiek en accuraat zijn voor dit onderscheid.

Door de neutralisatie van de pH bij de ACTN4-ELISA kon men besluiten dat deze biomarker op zichzelf binnen deze masterproef een sensitiviteit, specificiteit en accuraatheid van 100% heeft om ‘gezonde’ personen correct van precancereuze patiënten te kunnen onderscheiden. Dit moet zeker nog verder gevalideerd worden omdat de ACTN4 ELISA in dit werk getest werd op slechts 16 stalen. Deze steekproef is te klein om definitieve conclusies te trekken. De resultaten zijn hoopvol. Door de procedure voor pH optimalisatie voor stalen afgenomen in 5% azijnzuur verder te testen op meerdere stalen, kan dit resultaat in de toekomst hopelijk definitief bevestigd worden. Ook voor onderscheid 2 kregen we een accuraatheid van 94%, een sensitiviteit van 80% en specificiteit van 70% om d.m.v. ACTN4 de HSIL-stalen te kunnen onderscheiden van gezonde of LSIL-stalen. Hier kan men concluderen dat ACTN4 op zichzelf een goede diagnostische merker is om niet risico- en risicovolle patiënten voor HSIL te kunnen onderscheiden. Maar zoals hoger vermeld, moet men dezelfde opmerking maken dat er te weinig stalen getest werden om definitieve conclusies te trekken. Bovendien werd er voor de eerste maal aangetoond dat ACTN4 het onderscheid kan maken tussen hoge (HSIL) en lage (LSIL) intra-epitheliale laesies. Omdat de accuraatheid van ACTN4 voor onderscheid 2 op 94% ligt en deze voor het gebruik van een biomarker in een diagnostisch assay minstens op 95% moet liggen, werd er gekeken naar de combinatie van ACTN4 met 14-3-3 proteïne epsilon om deze waarden te verbeteren. De voorwaarde voor een goede combinatie assay was dat minstens één van de twee eiwitten boven de discriminerende *cutoff*-waarde moest liggen bij HSIL-stalen. Deze voorwaarde werd voor alle geteste stalen voldaan. Als algemene conclusie van deze thesis kunnen we stellen dat verder onderzoek, met een grotere steekproef noodzakelijk is om alle gevonden resultaten te kunnen bevestigen. Voor alle besproken kandidaat biomerkers moet bovendien één extra PTP geoptimaliseerd of gefinetuned worden.

Immunoassays, zoals ELISA, zijn in de Westerse wereld de standaard voor de detectie van eiwitten. Deze assays zijn echter niet praktisch in gebruik in derde wereldlanden omdat er daar een tekort is aan middelen of getraind personeel, terwijl de prevalentie voor HPV in deze landen juist het hoogst is (Finocchiaro-Kessler et al., 2016). Daartegenover staan de papieren immunoassays die goedkoop, snel, makkelijk in gebruik en transporteerbaar zijn (Chiu et al., 2015). Een papieren ELISA voor de detectie van baarmoederhalskanker is niet op de markt. Eerst dient een juiste en gevoelige combinatie van biomerkers gevonden te worden. De combinatie ACTN4 en 14-3-3 proteïne epsilon, of ACTN4 op zichzelf verder te onderzoeken, kan daarom de poort openen naar de ontwikkeling van een dergelijk assay.

Referenties

Reference List

Abedini,M.R., Wang,P.W., Huang,Y.F., Cao,M., Chou,C.Y., Shieh,D.B., and Tsang,B.K. (2014). Cell fate regulation by gelsolin in human gynecologic cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *111*, 14442-14447.

Aebersold,R. and Mann,M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* *422*, 198-207.

An,H.T., Kim,J., Yoo,S., and Ko,J. (2014). Small leucine zipper protein (sLZIP) negatively regulates skeletal muscle differentiation via interaction with alpha-actinin-4. *J. Biol. Chem.* *289*, 4969-4979.

Armstrong,E.P. (2010). Prophylaxis of cervical cancer and related cervical disease: a review of the cost-effectiveness of vaccination against oncogenic HPV types. *Journal of managed care pharmacy* *16*, 217-230.

Arnouk,H., Merkley,M.A., Podolsky,R.H., Stoppler,H., Santos,C., Alvarez,M., Mariategui,J., Ferris,D., Lee,J.R., and Dynan,W.S. (2009). Characterization of Molecular Markers Indicative of Cervical Cancer Progression. *Proteomics. Clin. Appl.* *3*, 516-527.

Babu,S.N., Chetal,G., and Kumar,S. (2012). Macrophage migration inhibitory factor: a potential marker for cancer diagnosis and therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* *13*, 1737-1744.

Bae,S.M., Lee,C.H., Cho,Y.L., Nam,K.H., Kim,Y.W., Kim,C.K., Han,B.D., Lee,Y.J., Chun,H.J., and Ahn,W.S. (2005). Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients. *Gynecol. Oncol.* *99*, 26-35.

Baker,E. (2013). HPV and Pap: shifting roles in cervical cancer screening. *Medical laboratory observer* *45*, 24, 26.

Barba-de la Rosa AP, Briones-Cerecero,E., Lugo-Melchor,O., De Leon-Rodriguez,A., Santos,L., Castelo-Ruelas,J., Valdivia,A., Pina,P., Chagolla-Lopez,A., Hernandez-Cueto,D., Mantilla,A., Lazos-Ochoa,M., Gonzalez-Yebra,B., and Salcedo,M. (2012). Hox B4 as potential marker of non-differentiated cells in human cervical cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *138*, 293-300.

Bodily,J. and Laimins,L.A. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology* *19*, 33-39.

Bodnar,W.M., Blackburn,R.K., Krise,J.M., and Moseley,M.A. (2003). Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* *14*, 971-979.

Boichenko,A.P., Govorukhina,N., Klip,H.G., van der Zee,A.G., Guzel,C., Luider,T.M., and Bischoff,R. (2014). A panel of regulated proteins in serum from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J. Proteome. Res.* *13*, 4995-5007.

Boon,S.S. and Banks,L. (2013). High-risk human papillomavirus E6 oncoproteins interact with 14-3-3zeta in a PDZ binding motif-dependent manner. *J. Virol.* *87*, 1586-1595.

Brun,V., Dupuis,A., Adrait,A., Marcellin,M., Thomas,D., Court,M., Vandenesch,F., and Garin,J. (2007). Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics.* *6*, 2139-2149.

- Cantor,S.B., Cardenas-Turanzas,M., Cox,D.D., Atkinson,E.N., Nogueras-Gonzalez,G.M., Beck,J.R., Follen,M., and Benedet,J.L. (2008). Accuracy of colposcopy in the diagnostic setting compared with the screening setting. *Obstet. Gynecol.* *111*, 7-14.
- Cheng,R.J., Deng,W.G., Niu,C.B., Li,Y.Y., and Fu,Y. (2011). Expression of macrophage migration inhibitory factor and CD74 in cervical squamous cell carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* *21*, 1004-1012.
- Chevolet and Gerris. *Correlatie cytologie, colposcopie en histologie.* 2009.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Chiu,R.Y., Thach,A.V., Wu,C.M., Wu,B.M., and Kamei,D.T. (2015). An Aqueous Two-Phase System for the Concentration and Extraction of Proteins from the Interface for Detection Using the Lateral-Flow Immunoassay. *PLoS. One.* *10*, e0142654.
- Choi,Y.P., Kang,S., Hong,S., Xie,X., and Cho,N.H. (2005). Proteomic analysis of progressive factors in uterine cervical cancer. *Proteomics.* *5*, 1481-1493.
- Cole,A.M. (2006a). Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *306*, 199-230.
- Cole,A.M. (2006b). Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *306*, 199-230.
- Cuzick,J., Arbyn,M., Sankaranarayanan,R., Tsu,V., Ronco,G., Mayrand,M.H., Dillner,J., and Meijer,C.J. (2008). Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* *26 Suppl 10*, K29-K41.
- Deligeoroglou,E., Giannouli,A., Athanasopoulos,N., Karountzos,V., Vatopoulou,A., Dimopoulos,K., and Creatsas,G. (2013). HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* *2013*, 540850.
- Dickson,E.L., Vogel,R.I., Luo,X., and Downs,L.S. (2015). Recent trends in type-specific HPV infection rates in the United States. *Epidemiol. Infect.* *143*, 1042-1047.
- Dijkstra,M.G., Snijders,P.J., Arbyn,M., Rijkaart,D.C., Berkhof,J., and Meijer,C.J. (2014). Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. *Annals of oncology.*
- Douglas,D.J., Frank,A.J., and Mao,D. (2005). Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* *24*, 1-29.
- Fan,J., Hitosugi,T., Chung,T.W., Xie,J., Ge,Q., Gu,T.L., Polakiewicz,R.D., Chen,G.Z., Boggon,T.J., Lonial,S., Khuri,F.R., Kang,S., and Chen,J. (2011). Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Molecular and Cellular Biology* *31*, 4938-4950.
- Fenn,J.B., Mann,M., Meng,C.K., Wong,S.F., and Whitehouse,C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* *246*, 64-71.
- Finocchiaro-Kessler,S., Wexler,C., Maloba,M., Mabachi,N., Ndikum-Moffor,F., and Bukusi,E. (2016). Cervical cancer prevention and treatment research in Africa: a systematic review from a public health perspective. *BMC. Womens Health* *16*, 29.

- Fusaro,V.A., Mani,D.R., Mesirov,J.P., and Carr,S.A. (2009). Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 27, 190-198.
- Graczyk,A., Slomnicki,L.P., and Lesniak,W. (2013). S100A6 competes with the TAZ2 domain of p300 for binding to p53 and attenuates p53 acetylation. *Journal of molecular biology* 425, 3488-3494.
- Guo,X., Hao,Y., Kamilijiang,M., Hasimu,A., Yuan,J., Wu,G., Reyimu,H., Kadeer,N., and Abudula,A. (2015). Potential predictive plasma biomarkers for cervical cancer by 2D-DIGE proteomics and Ingenuity Pathway Analysis. *Tumour. Biol.* 36, 1711-1720.
- Hamill,K.J., Hopkinson,S.B., Skalli,O., and Jones,J.C. (2013). Actinin-4 in keratinocytes regulates motility via an effect on lamellipodia stability and matrix adhesions. *FASEB J.* 27, 546-556.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harima,Y., Togashi,A., Horikoshi,K., Imamura,M., Sougawa,M., Sawada,S., Tsunoda,T., Nakamura,Y., and Katagiri,T. (2004). Prediction of outcome of advanced cervical cancer to thermoradiotherapy according to expression profiles of 35 genes selected by cDNA microarray analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 60, 237-248.
- Hecht,E.S., McCord,J.P., and Muddiman,D.C. (2016). A Quantitative Glycomics and Proteomics Combined Purification Strategy. *J. Vis. Exp.*
- Higareda-Almaraz,J.C., Enriquez-Gasca,M.R., Hernandez-Ortiz,M., Resendis-Antonio,O., and Encarnacion-Guevara,S. (2011). Proteomic patterns of cervical cancer cell lines, a network perspective. *BMC systems biology* 5, 96.
- Ho,C.S., Lam,C.W., Chan,M.H., Cheung,R.C., Law,L.K., Lit,L.C., Ng,K.F., Suen,M.W., and Tai,H.L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin. Biochem. Rev.* 24, 3-12.
- Holm,R., Ali,T., Svendsrud,D.H., Nesland,J.M., Kristensen,G.B., and Lyng,H. (2009). Expression of 14-3-3sigma in cervical squamous cell carcinomas: relationship with clinical outcome. *Oncol. Rep.* 22, 11-15.
- Huang,L., Zheng,M., Zhou,Q.M., Zhang,M.Y., Jia,W.H., Yun,J.P., and Wang,H.Y. (2011a). Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer* 117, 3363-3373.
- Huang,L., Zheng,M., Zhou,Q.M., Zhang,M.Y., Jia,W.H., Yun,J.P., and Wang,H.Y. (2011b). Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer* 117, 3363-3373.
- Hwang,Y.J., Lee,S.P., Kim,S.Y., Choi,Y.H., Kim,M.J., Lee,C.H., Lee,J.Y., and Kim,D.Y. (2009). Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer. *Yonsei Med. J.* 50, 399-406.
- Jeong,D.H., Kim,H.K., Prince,A.E., Lee,D.S., Kim,Y.N., Han,J., and Kim,K.T. (2008). Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J. Gynecol. Oncol.* 19, 173-180.
- Karimi-Zarchi,M., Peighambari,F., Karimi,N., Rohi,M., and Chiti,Z. (2013). A Comparison of 3 Ways of Conventional Pap Smear, Liquid-Based Cytology and Colposcopy vs Cervical Biopsy for Early Diagnosis of Premalignant Lesions or Cervical Cancer in Women with Abnormal Conventional Pap Test. *Int. J. Biomed. Sci.* 9, 205-210.

- Kikkawa,F., Mizuno,M., Shibata,K., Kajiyama,H., Morita,T., Ino,K., Nomura,S., and Mizutani,S. (2004a). Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *190*, 1258-1263.
- Kikkawa,F., Mizuno,M., Shibata,K., Kajiyama,H., Morita,T., Ino,K., Nomura,S., and Mizutani,S. (2004b). Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *190*, 1258-1263.
- Kohler,K. and Seitz,H. (2012). Validation processes of protein biomarkers in serum--a cross platform comparison. *Sensors. (Basel)* *12*, 12710-12728.
- Kolsrud Hustoft H., Malerod H., Reubsæet L., Wilson S.R., undanes E., and Greibrokk T. (2012). A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics, Integrative Proteomics.
- Koukourakis,M.I., Kontomanolis,E., Giatromanolaki,A., Sivridis,E., and Liberis,V. (2009). Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. *Gynecologic and Obstetric Investigation* *67*, 162-168.
- Krockenberger,M., Engel,J.B., Kolb,J., Dombrowsky,Y., Hausler,S.F., Kohrenhagen,N., Dietl,J., Wischhusen,J., and Honig,A. (2010). Macrophage migration inhibitory factor expression in cervical cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* *136*, 651-657.
- Lesniak,W., Slomnicki,L.P., and Filipek,A. (2009). S100A6 – New facts and features. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *390*, 1087-1092.
- Liao,C.J., Wu,T.I., Huang,Y.H., Chang,T.C., Wang,C.S., Tsai,M.M., Hsu,C.Y., Tsai,M.H., Lai,C.H., and Lin,K.H. (2011). Overexpression of gelsolin in human cervical carcinoma and its clinicopathological significance. *Gynecol. Oncol.* *120*, 135-144.
- Lin,Y.W., Lai,H.C., Lin,C.Y., Chiou,J.Y., Shui,H.A., Chang,C.C., Yu,M.H., and Chu,T.Y. (2006). Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Cancer* *16*, 1216-1224.
- Liu,C., Pan,C., Shen,J., Wang,H., Yong,L., and Zhang,R. (2011). Discrimination analysis of mass spectrometry proteomics for cervical cancer detection. *Med. Oncol.* *28 Suppl 1*, S553-S559.
- Liu,Y., Wei,F., Wang,F., Li,C., Meng,G., Duan,H., Ma,Q., and Zhang,W. (2015). Serum peptidome profiling analysis for the identification of potential biomarkers in cervical intraepithelial neoplasia patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *465*, 476-480.
- Lokamani,I., Looi,M.L., Md Ali,S.A., Mohd Dali,A.Z., Ahmad Annuar,M.A., and Jamal,R. (2014). Gelsolin and ceruloplasmin as potential predictive biomarkers for cervical cancer by 2D-DIGE proteomics analysis. *Pathol. Oncol. Res.* *20*, 119-129.
- Longuespee,R., Boyon,C., Castellier,C., Jacquet,A., Desmons,A., Kerdraon,O., Vinatier,D., Fournier,I., Day,R., and Salzet,M. (2012). The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling. *Histochemistry and Cell Biology* *138*, 141-154.
- Looi,M.L., Karsani,S.A., Rahman,M.A., Dali,A.Z., Ali,S.A., Ngah,W.Z., and Yusof,Y.A. (2009). Plasma proteome analysis of cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *J. Biosci.* *34*, 917-925.

Makarewicz,R., Drewa,G., Szymanski,W., and Skonieczna-Makarewicz,I. (1995). Cathepsin B in predicting the extent of the cervix carcinoma. *Neoplasma* 42, 21-24.

Makawita,S. and Diamandis,E.P. (2010). The bottleneck in the cancer biomarker pipeline and protein quantification through mass spectrometry-based approaches: current strategies for candidate verification. *Clin. Chem.* 56, 212-222.

Martin-Hirsch,P.L. and Wood,N.J. (2011). Cervical cancer. *Clinical evidence online* 2011.

Merkley,M.A., Hildebrandt,E., Podolsky,R.H., Arnouk,H., Ferris,D.G., Dynan,W.S., and Stoppler,H. (2009). Large-scale analysis of protein expression changes in human keratinocytes immortalized by human papilloma virus type 16 E6 and E7 oncogenes. *Proteome. Sci.* 7, 29.

Metz,C.E. (1978). Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.* 8, 283-298.

Mohammed,S.I., Ren,W., Flowers,L., Rajwa,B., Chibwasha,C.J., Parham,G.P., and Irudayaraj,J.M. (2016). Point-of-care test for cervical cancer in LMICs. *Oncotarget*.

Mu,A.K., Lim,B.K., Aminudin,N., Hashim,O.H., and Shuib,A.S. (2016). Application of SELDI-TOF in N-glycopeptides profiling of the urine from patients with endometrial, ovarian and cervical cancer. *Arch. Physiol Biochem.* 122, 111-116.

Nowotny,M., Bhattacharya,S., Filipek,A., Krezel,A.M., Chazin,W., and Kuznicki,J. (2000). Characterization of the interaction of calyculin (S100A6) and calyculin-binding protein. *The journal of biological chemistry* 275, 31178-31182.

Ossendorp,F., Fu,N., Camps,M., Granucci,F., Gobin,S.J., van den Elsen,P.J., Schuurhuis,D., Adema,G.J., Lipford,G.B., Chiba,T., Sijts,A., Kloetzel,P.M., Ricciardi-Castagnoli,P., and Melief,C.J. (2005). Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells. *The Journal of Immunology* 174, 7815-7822.

Paxton A. Houston study augurs possible shift in hrHPV genotypes. *Cap Today Online* . 2013.
Ref Type: In Press

Petrosky,E., Bocchini,J.A., Jr., Hariri,S., Chesson,H., Curtis,C.R., Saraiya,M., Unger,E.R., and Markowitz,L.E. (2015). Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64, 300-304.

Qin,F., Song,Y., Li,Z., Zhao,L., Zhang,Y., and Geng,L. (2010). S100A8/A9 induces apoptosis and inhibits metastasis of CasKi human cervical cancer cells. *Pathology & Oncology Research* 16, 353-360.

Reverberi,R. and Reverberi,L. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.* 5, 227-240.

Ronco,G., Segnan,N., Giorgi-Rossi,P., Zappa,M., Casadei,G.P., Carozzi,F., Dalla,P.P., Del,M.A., Folicaldi,S., Gillio-Tos,A., Nardo,G., Naldoni,C., Schincaglia,P., Zorzi,M., Confortini,M., and Cuzick,J. (2006). Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 765-774.

Saah,A.J. and Hoover,D.R. (1998). [Sensitivity and specificity revisited: significance of the terms in analytic and diagnostic language]. *Ann. Dermatol. Venereol.* 125, 291-294.

Salehin,D., Fromberg,I., Haugk,C., Dohmen,B., Georg,T., Bohle,R.M., Bauerschlag,D., Maass,N., and Friedrich,M. (2010). Immunohistochemical analysis for expression of calpain 1, calpain 2 and calpastatin in endometrial cancer. *Anticancer research* 30, 2837-2843.

Salehin,D., Fromberg,I., Haugk,C., Dohmen,B., Georg,T., Bohle,R.M., Bauerschlag,D., Thill,M., and Friedrich,M. (2011). Immunohistochemical analysis for expression of calpain 1, calpain 2 and calpastatin in ovarian cancer. *European journal of gynaecological oncology* 32, 628-635.

Santa,C., Anjo,S.I., and Manadas,B. (2016). Protein precipitation of diluted samples in SDS-containing buffer with acetone leads to higher protein recovery and reproducibility in comparison with TCA/acetone approach. *Proteomics*.

Semenza,G.L., Jiang,B.H., Leung,S.W., Passantino,R., Concordet,J.P., Maire,P., and Giallongo,A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 32529-32537.

Sherman,J., McKay,M.J., Ashman,K., and Molloy,M.P. (2009). Unique ion signature mass spectrometry, a deterministic method to assign peptide identity. *Mol. Cell Proteomics.* 8, 2051-2062.

Silberring,J. and Ciborowski,P. (2010). Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends Analyt. Chem.* 29, 128.

Smith-Beckerman,D.M., Fung,K.W., Williams,K.E., Auersperg,N., Godwin,A.K., and Burlingame,A.L. (2005). Proteome changes in ovarian epithelial cells derived from women with BRCA1 mutations and family histories of cancer. *Mol. Cell Proteomics.* 4, 156-168.

Snijders K. and Van Ostade X. Verificatie van potentiële biomerkers in het cervicovaginaal vocht voor HPV-infectie en/of cervixkanker. 2015.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Song,J.Y., Bae,H.S., Koo,d.H., Lee,J.K., Jung,H.H., Lee,K.W., and Lee,N.W. (2012). Candidates for tumor markers of cervical cancer discovered by proteomic analysis. *J. Korean Med. Sci.* 27, 1479-1485.

Stanley,M. (2010). Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology* 117, S5-10.

Storr,S.J., Safuan,S., Woolston,C.M., Abdel-Fatah,T., Deen,S., Chan,S.Y., and Martin,S.G. (2012). Calpain-2 expression is associated with response to platinum based chemotherapy, progression-free and overall survival in ovarian cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 16, 2422-2428.

Tambor,V., Fucikova,A., Lenco,J., Kacerovsky,M., Rehacek,V., Stulik,J., and Pudil,R. (2010). Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res.* 59, 471-497.

Tietz (2006). *Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*.

Tihonov,M.M., Kim,V.V., and Noskov,B.A. (2016). Impact of a Reducing Agent on the Dynamic Surface Properties of Lysozyme Solutions. *J. Oleo. Sci.*

Valkenburg N. and Van Ostade X. Validatie van Proteïne Biomerkers voor Baarmoederhalskanker door middel van Multiple Reaction Monitoring (MRM). 2014a.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Valkenborg N. and Van Ostade X. Validatie van Proteïne Biomerkers voor Baarmoederhalskanker door middel van Multiple Reaction Monitoring (MRM). 2014b.

Ref Type: Thesis/Dissertation

van Dam,H.T., Seifert,S., and Schaart,D.R. (2012). The statistical distribution of the number of counted scintillation photons in digital silicon photomultipliers: model and validation. *Phys. Med. Biol.* 57, 4885-4903.

Van de Velde, Lissa and Van Ostade, Xaveer. Biomerkers voor Cervixkanker in het Cervicovaginale vocht: Identificatie en Opstellen van een Gevoelige Assay. 2013. Universiteit Antwerpen.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Van Ostade,X.W., Dom,M., and Van Raemdonck,G.A. (2014). IPA Analysis of Cervicovaginal Fluid from Precancerous Women Points to the Presence of Biomarkers for the Precancerous State of Cervical Carcinoma. *Proteomes* 2, 426-450.

Van Raemdonck G.

Identification of protein biomarkers for sexually transmitted diseases using cervicovaginal fluid. 2014. University of Antwerp.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Van Raemdonck,G.A., Tjalma,W.A., Coen,E.P., Depuydt,C.E., and Van Ostade,X.W. (2014). Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid. *PLoS. One.* 9, e106488.

Van Raemdock G., Zegels,G., Coen,E., Vuylsteke,B., Jennes,W., and Van Ostade, X (2014). Increased Serpin A5 levels in the cervicovaginal fluid of HIV-1 exposed seronegatives suggest that a subtle balance between serine proteases and their inhibitors may determine susceptibility to HIV-1 infection. *Virology* 458-459, 11-21.

Verguts J. Het Colposcopisch Onderzoek: UZ Leuven. 17-6-2011.

Ref Type: Slide

Wang,S., Xiao,Z., Xiao,C., Wang,H., Wang,B., Li,Y., Chen,X., and Guo,X. (2016). (E)-Propyl alpha-Cyano-4-Hydroxyl Cinnamate: A High Sensitive and Salt Tolerant Matrix for Intact Protein Profiling by MALDI Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27, 709-718.

Wang,T., Kumru,O.S., Yi,L., Wang,Y.J., Zhang,J., Kim,J.H., Joshi,S.B., Middaugh,C.R., and Volkin,D.B. (2013a). Effect of ionic strength and pH on the physical and chemical stability of a monoclonal antibody antigen-binding fragment. *J. Pharm. Sci.* 102, 2520-2537.

Wang,T., Kumru,O.S., Yi,L., Wang,Y.J., Zhang,J., Kim,J.H., Joshi,S.B., Middaugh,C.R., and Volkin,D.B. (2013b). Effect of ionic strength and pH on the physical and chemical stability of a monoclonal antibody antigen-binding fragment. *J. Pharm. Sci.* 102, 2520-2537.

Wong,Y.F., Cheung,T.H., Lo,K.W., Wang,V.W., Chan,C.S., Ng,T.B., Chung,T.K., and Mok,S.C. (2004). Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Lett.* 211, 227-234.

Wu,D., Wang,H., Li,Z., Wang,L., Zheng,F., Jiang,J., Gao,Y., Zhong,H., Huang,Y., and Suo,Z. (2012). Cathepsin B may be a potential biomarker in cervical cancer. *Histol. Histopathol.* 27, 79-87.

- Xia,J., Broadhurst,D.I., Wilson,M., and Wishart,D.S. (2013). Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics*. 9, 280-299.
- Xiao,D.Z., Dai,B., Chen,J., Luo,Q., Liu,X.Y., Lin,Q.X., Li,X.H., Huang,W., and Yu,X.Y. (2011). Loss of macrophage migration inhibitory factor impairs the growth properties of human HeLa cervical cancer cells. *Cell Prolif.* 44, 582-590.
- Zegels,G., Van Raemdonck,G.A., Coen,E.P., Tjalma,W.A., and Van Ostade,X.W. (2009). Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples. *Proteome. Sci.* 7, 17.
- Zhao,Q., He,Y., Wang,X.L., Zhang,Y.X., and Wu,Y.M. (2015). Differentially expressed proteins among normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *Clin. Transl. Oncol.* 17, 620-631.
- Zhu,H., Liu,L., Liu,H., Wu,T., Wu,Y., Zeng,S., and Zeng,L. (2013a). [Expression of galectin-7 and S100A9 and development of cervical squamous carcinoma]. *Journal of Central South university - medical sciences* 38, 888-895.
- Zhu,H., Wu,T.C., Chen,W.Q., Zhou,L.J., Wu,Y., Zeng,L., and Pei,H.P. (2013b). Roles of galectin-7 and S100A9 in cervical squamous carcinoma: Clinicopathological and in vitro evidence. *International Journal of Cancer* 132, 1051-1059.
- Zhu,X., Lv,J., Yu,L., Zhu,X., Wu,J., Zou,S., and Jiang,S. (2009). Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 112, 248-256.
- Zweig,M.H. and Campbell,G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39, 561-577.

Bijlagen

1 Literatuur kandidaat biomerkers

Eiwit	Biologische functie	Correlatie met (cervix)kanker	Referentie
<p>14-3-3 protein epsilon</p>	<ul style="list-style-type: none"> Geconserveerde regulatorische moleculen die verschillende soorten signaalmoleculen kan binden zoals kinases en fosfatases 	<ul style="list-style-type: none"> Gereduceerde immunokleuring van 14-3-3 protein sigma in het cytoplasma en het transport van dat eiwit in de kern zijn twee mogelijke mechanismen die de carcinogenese van baarmoederhalskanker kunnen verklaren. Correlatie van 14-3-3 zeta proteïne expressie met lymfeknoop metastasis in patiënten met cervixkanker in een vroeg stadium. 14-3-3 zeta proteïne heeft een sleutelrol in de beslissing richting proliferatie of celdood. 14-3-3 familieleden zijn dus belangrijke regulatoren bij de carcinogenese. E6 oncoproteïnen van HR-HPV-types interageren met het 14-3-3 zeta proteïne via een PDZ domein. 	<p>(Van Ostade et al., 2014), (Higareda-Almaraz et al., 2011)</p> <p>(Huang et al., 2011b), (Holm et al., 2009), (Boon and Banks, 2013)</p>
<p>Alfa-actinine 4 (ACTN4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Belangrijke rol in de motiliteit van immuuncellen en fibroblasten, bij de vorming van Cadherine cel-cel interacties, bij de assemblage van de verbindingen tussen actine en de Z-schijf in spiercellen, bij het crosslinken van actine en bij het bevestigen van het cytoskelet aan het celmembraan. 	<ul style="list-style-type: none"> ACTN4 komt met verhoogde expressie voor in precancereuze cervixstalen maar niet in gezonde controle stalen. Bij de start van een HPV-infectie zal de concentratie ACTN4 stijgen en weer dalen als de infectie ten einde loopt. Infecties over een langere periode doen de concentratie stijgen. Een hoog ACTN4 level zou dus gebruikt kunnen worden als indicatie voor een persisterende, oncogene HPV infectie en een verhoogd risico op de ontwikkeling tot cervixkanker. Accumulatie van ACTN4 geeft een slechte prognose bij ovariumkanker (OC). 	<p>(Van Raemdonck et al., 2014)</p> <p>(Hamill et al., 2013), (An et al., 2014), (Bodily and Laimins, 2011)</p>
<p>Angiotensinogeen</p>	<ul style="list-style-type: none"> Precursor voor Angiotensine II (Ang II). Constitutief geproduceerd α2-globuline. 	<ul style="list-style-type: none"> Ang II is betrokken bij de progressie van cervixkanker door de inductie van VEGF secretie via de Angiotensine II type I receptor. De tumorcellen worden meer invasief. Correlatie tussen de Angiotensine II type I receptor expressie en de progressie van precancereus weefsel tot een invasief cervicaal carcinoma. 	<p>(Van Ostade et al., 2014)</p> <p>(Kikkawa et al., 2004b)</p>

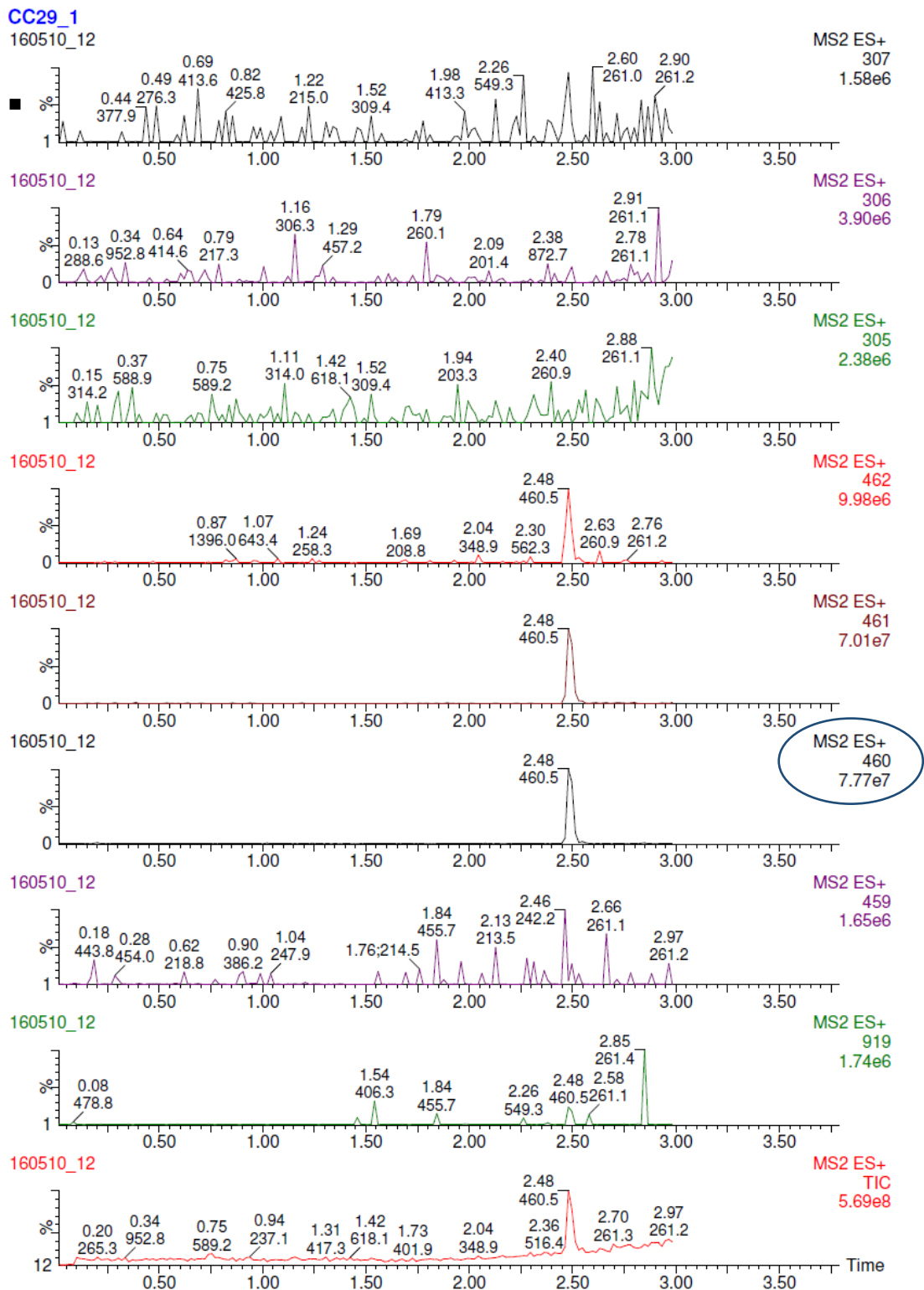
Eiwit	Biologische functie	Correlatie met (cervix)kanker	Referentie
Calcycline (S100A6)	<ul style="list-style-type: none"> • Calciumsensor en modulator. • Reorganisatie actine cytoskelet in de cel. • Hoge expressie bij sterk prolifererende cellen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Celcyclus afhankelijke expressie. • S100A6 treedt in competitie met p300. P300 reguleert de p53-afhankelijke apoptose na DNA-schade. Calcycline inhibeert dus deze apoptose. 	<p>(Van de Velde and Van Ostade, 2013) (Lesniak et al., 2009), (Graczyk et al., 2013), (Nowotny et al., 2000)</p>
Calgranuline B (S100A9)	<ul style="list-style-type: none"> • Ca²⁺-bindingseiwit. • Chemotaxis induceren, fagocytose stimuleren en degranulatie van neutrofielen bevorderen. • Aantrekken en adhesie van leukocyten en cytokine productie als inflammatoire functie. 	<ul style="list-style-type: none"> • Expressie neemt gradueel af van normaal cervixweefsel naar CIN en carcinoom. De expressie is 80,0% bij CIN1 t.o.v. 27,3% bij CIN3 en 20;2% bij een cervixcarcinoom. • Afwezigheid van S100A9 in het staal resulteert in een verminderde vijf jaar overlevingskans. • Pelvische lymfekliermetastasen (PLNM) komen minder voor wanneer S100A9 aanwezig is. Dit omdat Calgranuline B de werking van Matrixmetalloproteases onderdrukt. De tumor is daardoor minder invasief. 	<p>(Van de Velde and Van Ostade, 2013) (Qin et al., 2010), (Zhu et al., 2013a), (Zhu et al., 2013b)</p>
Calpastatine (ICAL)	<ul style="list-style-type: none"> • Specifieke endogene inhibitor van Calpaïne I en II, Ca²⁺-afhankelijke cysteïne proteases. • In de aanwezigheid van Ca²⁺ zal ICAL aan Calpaïne binden en zijn protease-activiteit inhiberen. • Calpastatine, Calpaïne I en Calpaïne II vormen samen het Calpaïne systeem. • Functie bij apoptose, necrose en ischemie. 	<ul style="list-style-type: none"> • Verband tussen ICAL en baarmoederhalskanker is nog niet bewezen, wel voor ICAL en endometriumkanker, eierstokkanker en borstkanker. • Het Calpaïne systeem is gelokaliseerd in het cytoplasma van de eierstokkankercellen. Maar er is specifiek voor ICAL een verhoogde nucleaire aankleuring. • Eierstoktumoren vertonen een verhoogde expressie van het Calpaïne systeem. • Bij EC is een verhoogde expressie van ICAL aangetoond ten opzichte van het benigne endometriumweefsel. De verhoogde expressie is niet gecorreleerd met het stadium waarin de tumor zich bevindt. 	<p>(Van de Velde and Van Ostade, 2013) (Salehin et al., 2010), (Salehin et al., 2011), (Storr et al., 2012)</p>

Eiwit	Biologische functie	Correlatie met (cervix)kanker	Referentie
Cathepsine B	<ul style="list-style-type: none"> • Protease dat de extracellulaire matrix kan afbreken. • Rol in eiwit turnover. • Wordt in benigne cellen voornamelijk gestockeerd in de lysosomen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cathepsine B expressie werd aangetoond in HeLa cellen. • Verhoogde expressie werd terug gevonden in 64% van de patiënten met cervixkanker. • Cel proliferatie, tumorgroei, migratie en invasie van de HeLa cellen is significant gestegen in vergelijking met controle cellen. • Cathepsine B expressie in invasieve carcinoma 's ligt significant hoger dan deze in CIN's en normale weefsels. • De expressie in invasieve carcinoma 's is gecorreleerd met de tumor invasiediepte en lymfeklier metastasen. 	<p>(Van Ostade et al., 2014)</p> <p>(Harima et al., 2004), (Wu et al., 2012), (Makarewicz et al., 1995)</p>
F-actin-capping protein subunit alpha-2 (Capza2)	<ul style="list-style-type: none"> • Bindt op een Ca²⁺-onafhankelijke manier aan snelgroeiende actine filamenten om de uitwisseling van subunits aan dat einde te inhiberen. In tegenstelling tot Gelsoline zal het de actinefilamenten niet afbreken. 	<ul style="list-style-type: none"> • Nog geen verband gevonden met cervixkanker, wel bij ovariumkanker veroorzaakt door mutaties in het BRCA1 gen. Er is daar een downregulatie van Capza2 gevonden. 	<p>(Van Ostade et al., 2014)</p> <p>(Smith-Beckerman et al., 2005)</p>
Gelsoline (GSN)	<ul style="list-style-type: none"> • Controleert actine dynamieken. • Regulatorische functie bij het celmetabolisme en overleving. • Rol in signaal pathways voor motiliteit, apoptose, proliferatie, differentiatie en epitheliale mesenchymale transitie. 	<ul style="list-style-type: none"> • Gelsoline wordt overgeëxprimeerd in HeLa cellen ter vergelijking met HaCaT cellen • Gelsoline levels zijn bij 78% van de cervixkankerpatiënten geupreguleerd en de levels zijn ook 2.2x hoger t.o.v. gezonde controlepersonen. • Het expressie niveau verschilt t.o.v. het stadium van de tumor. • Overlevingskans is hoger bij patiënten met een lage expressie. • Speelt een rol bij gynaecologische chemoresistentie . • Kankercellen met een lage expressie hebben een verminderd migratie en proliferatie patroon. 	<p>(Van Ostade et al., 2014)</p> <p>(Abedini et al., 2014),(Higareda-Almaraz et al., 2011), (Liao et al., 2011), (Lokamani et al., 2014)</p>
Lactaat dehydrogenase A (LDHA)	<ul style="list-style-type: none"> • Enzyme dat in de anaerobe glycolyse de omzetting van pyruvaat en NADH naar lactaat en NAD⁺ katalyseert. 	<ul style="list-style-type: none"> • LDHA expressie neemt toe onder invloed van hypoxie. • LDHA wordt gebruikt in een panel van 11 merkers bij de detectie van PLNM bij cervixkanker. De accurateheid, specificiteit en sensitiviteit van het panel ligt rond 90%. • De verhoogde expressie van LDHA zorgt voor een verminderde vijf jaar overleving. 	<p>(Van de Velde and Van Ostade, 2013)</p> <p>(Fan et al., 2011), (Semenza et al., 1996), (Koukourakis et al., 2009)</p>

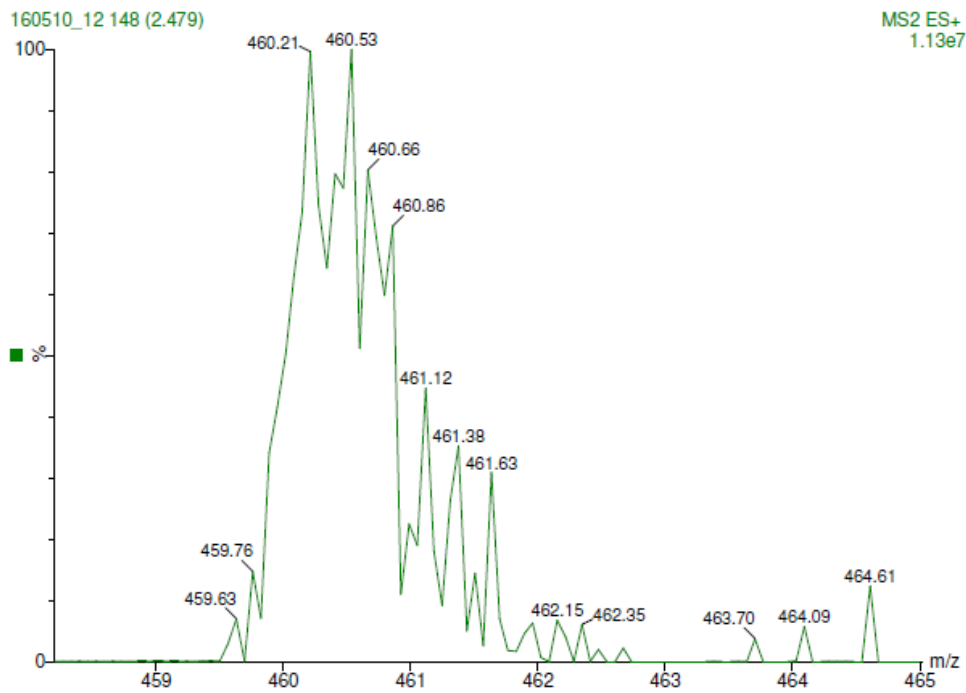
Eiwit	Biologische functie	Correlatie met (cervix)kanker	Referentie
Macrofaag migratie inhibitie factor (MIF)	<ul style="list-style-type: none"> • Pro-inflammatoir cytokine geproduceerd door monocyten/ macrofagen. • Betrokken bij aangeboren immuunrespons. • Stuurt macrofaag in haar functies. 	<ul style="list-style-type: none"> • MIF is overgeëxprimeerd in HeLa cellen t.o.v. HaCaT cellen. • Toegenomen expressie bij cervixkanker t.o.v. lage tot afwezige expressie bij gezonde controles. • Stijgende expressie naarmate het ontwikkelingsproces van cervixkanker vordert. • Cervixkanker in een vroeg stadium, lymfatische metastasis en slecht gedifferentieerde carcinoma's hebben hogere serumlevels van MIF. • Rol bij de interactie met p53 en p21, tumorgroei, angiogenese en het ontstaan van. Over expressie van MIF leidt tot een vermindering in expressie van p21 en p53. Hierdoor zal de apoptose die normaal door p53 wordt geïnduceerd niet op gang komen en blijft de baarmoederhalstumor ongecontroleerd verder delen. • Bij een overexpressie van MIF ondervindt de tumor een proliferatief voordeel. 	<p>(Van Ostade et al., 2014), (Van de Velde and Van Ostade, 2013)</p> <p>(Babu et al., 2012), (Krockenberger et al., 2010), (Higareda-Almaraz et al., 2011), (Xiao et al., 2011), (Cheng et al., 2011)</p>
Proteasoom activator complex 1 (PSME1)	<ul style="list-style-type: none"> • Opgebouwd uit 3 subunits: α, β en γ • MHC I antigen presentatie stimuleren. 	<ul style="list-style-type: none"> • Geen verband met cervixkanker, wel met eierstokkanker. • Prevalentie van 80% voor OC. • Merker bij gezonde cellen aanwezig in kern, bij maligne cellen in cytoplasma. 	<p>(Van de Velde and Van Ostade, 2013)</p> <p>(Longuespee et al., 2012), (Ossendorp et al., 2005)</p>

Bijlage 1. De literatuur opgezocht omtrent cervixkanker en gynaecologische tumoren in het algemeen, voor de selectie van kandidaat biomerkers.

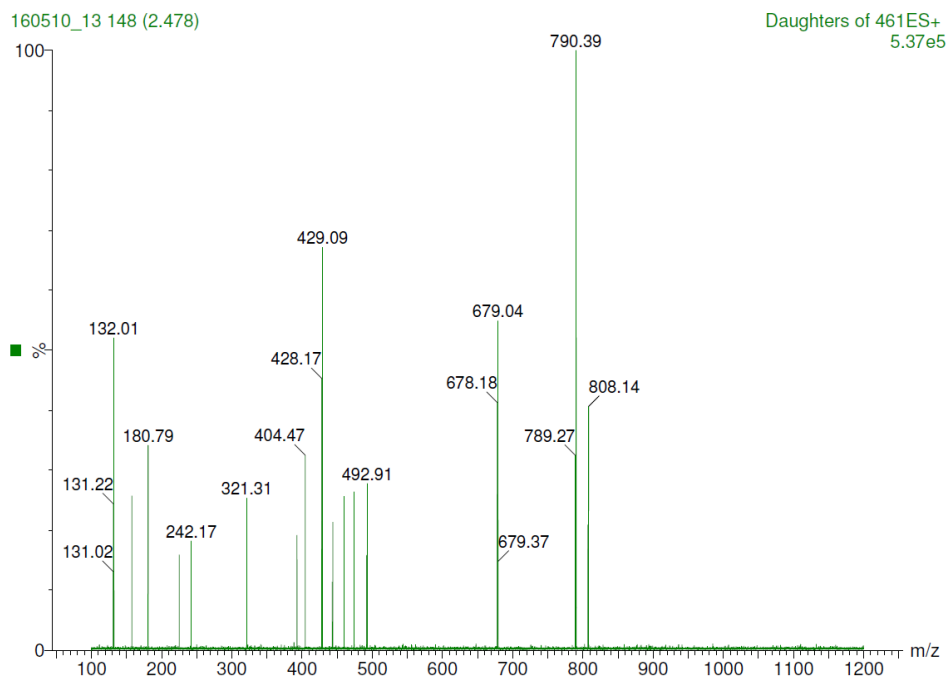
2 Optimisatieproces 1^{ste} PTP Calcycline (CC29_1)



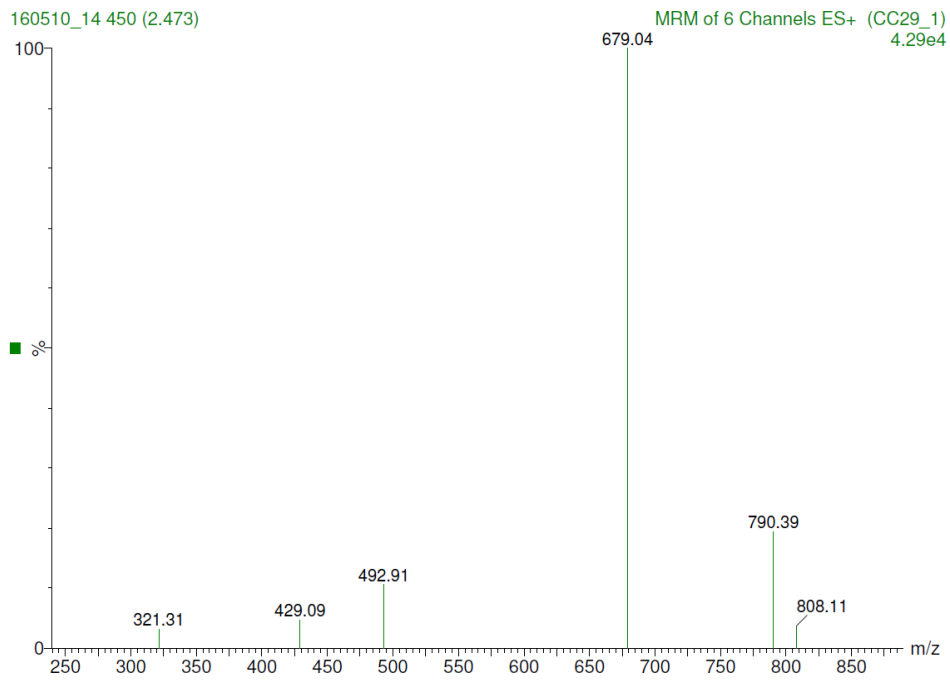
Figuur 1. Verkennende MS-scan voor CC29_1 bij de verschillende m/z-waarden. Het hoogste signaal is bij 460 Da op 2,48 min.



Figuur 2. Als eerste stap in het optimalisatieproces van een PTP werd een verkennende MS-scan en UPLC-run uitgevoerd. Hierdoor kan men op deze manier de elutietijd en de m/z-waarde van het precursor ion bepalen. Het peptide heeft een moleculair gewicht van 918,98Da (1-waardig geladen) dus 459,49 Da als het 2-waardig- en 306,33 Da als het 3-waardig geladen zou zijn. Op het chromatogram is duidelijk te zien dat bij 460,50 Da, op 2,48min, het hoogste signaal voorkomt (7,77E7). Dit werd ook nagekeken op het spectrum en op basis hiervan wordt er gekozen voor 460,53 Da als precursorion.



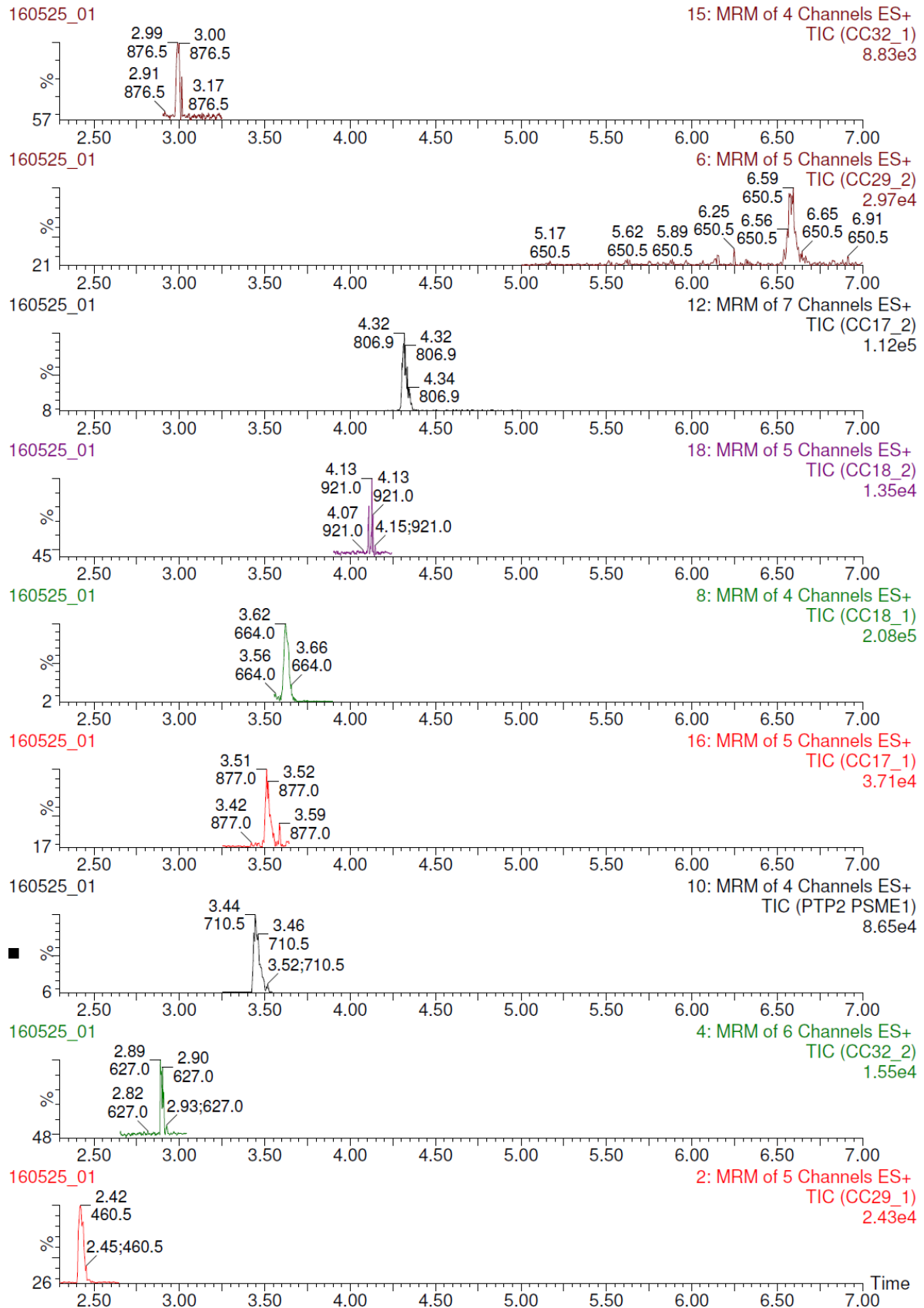
Figuur 3. Daughter-scan van CC29_1. Op het spectrum is een goede fragmentatie van het precursor ion (640,53 Da) te zien. De collision energie is ingesteld op 18eV. De volgende fragmenten werden geselecteerd: 321,31 Da; 429,09 Da; 492,91Da; 679,04 Da; 790,39 Da en 808,14 Da.



Figuur 4. MRM van het peptide. De signaal/ruis verhouding van alle fragmenten behalve 312,31Da is goed, dit fragment wordt dan ook niet meegenomen voor de optimalisatie van het peptide.

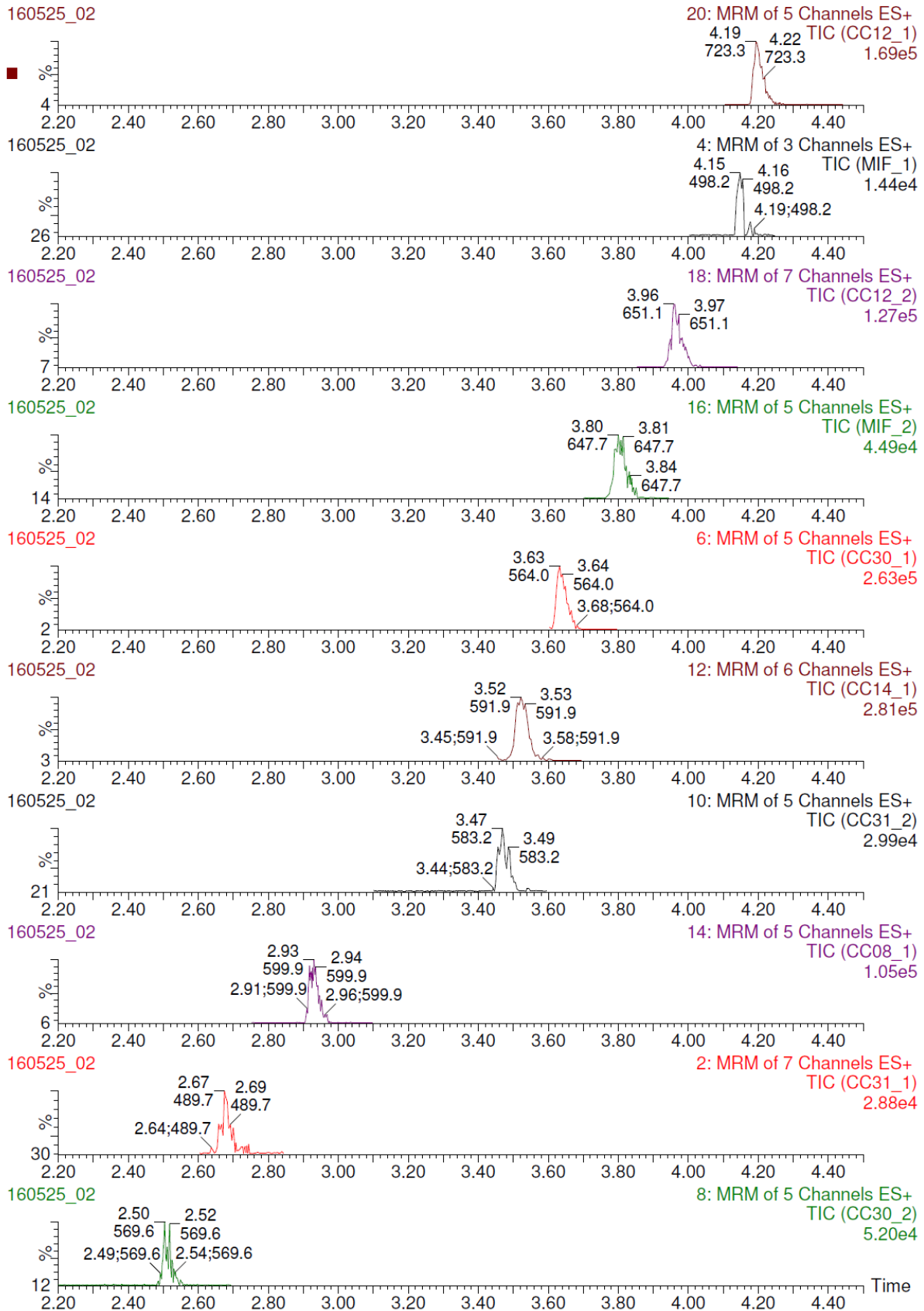
3 Controle finale multiplex analyse

Test MRM1



Test MRM2

160525_02

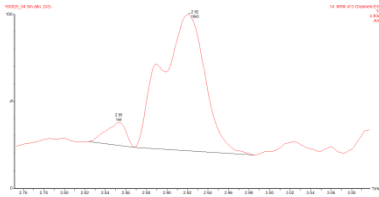


Bijlage 2. Er werd gecontroleerd of elk peptide goed van elkaar te onderscheiden valt en de ingestelde fixatietijden goed zijn. MRM1 test alle peptiden uit run 1, MRM2 al die van run 2.

4 Data analyse (AUC-bepaling) 14-3-3 Proteïne epsilon in alle stalen

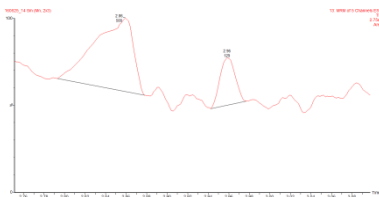
CC08_1: 14-3-3 Proteïne epsilon

isotopisch gelabeld peptide

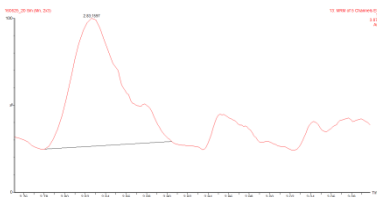


Gezond

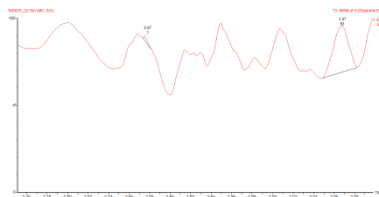
UZA 37



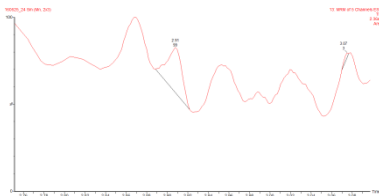
UZA 44



UZA 47



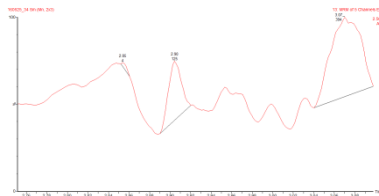
UZA 54



UZA 62

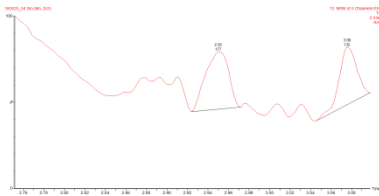


UZA 74



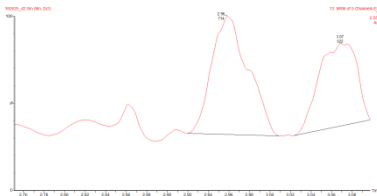
Gezond + HIV

UZA 14



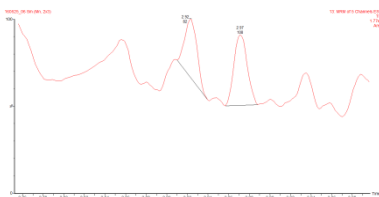
Gezond + Bloed

UZA 81

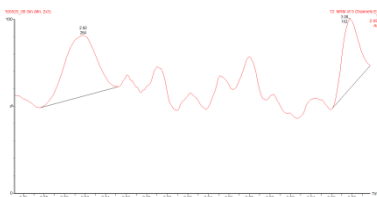


Gezond + HPV

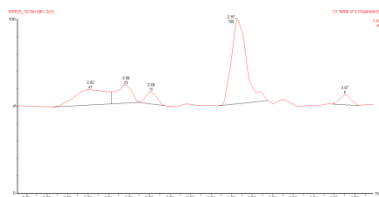
UZA 23



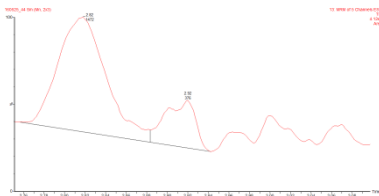
UZA 26



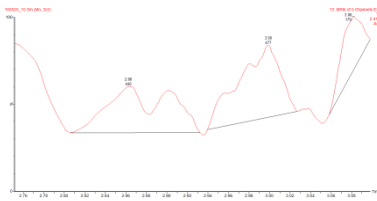
UZA 72



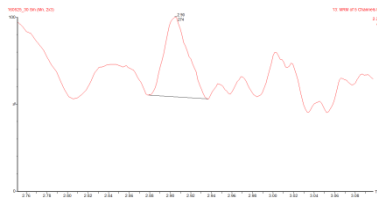
UZA 83



LSIL + HIV
UZA 34

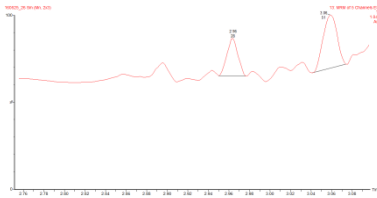


UZA 71

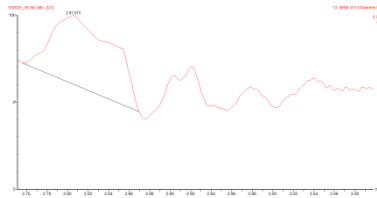


LSIL

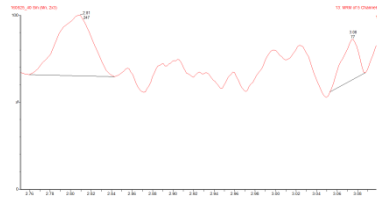
UZA 61



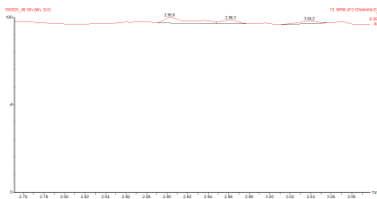
UZA 75



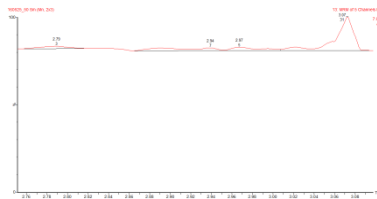
UZA 79



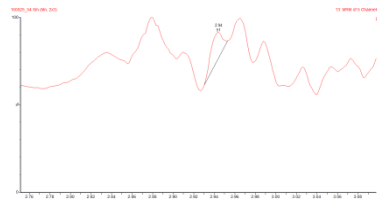
UZA 86



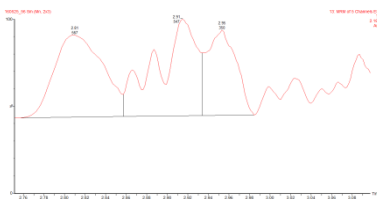
UZA 88



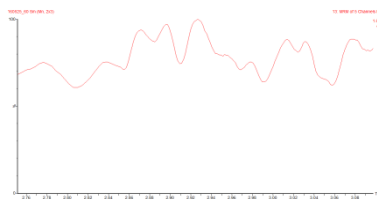
UZA 90



UZA 95

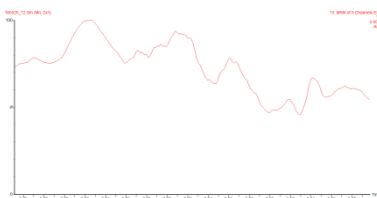


UZA 101

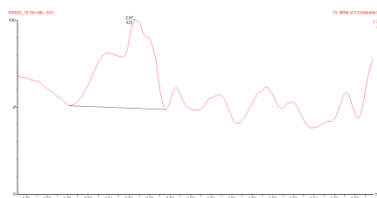


HSIL

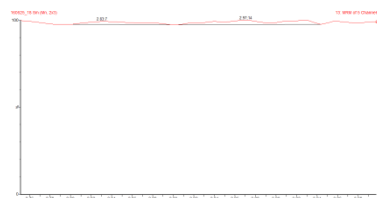
UZA 35



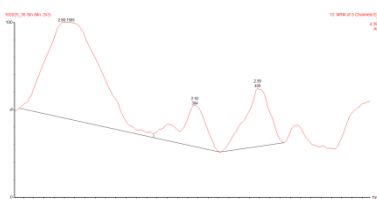
UZA 40



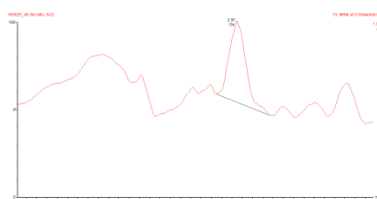
UZA 41



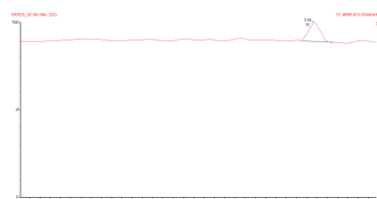
UZA 78



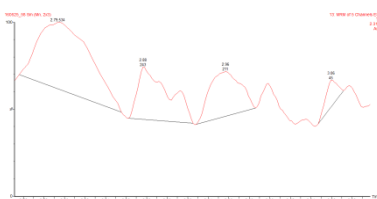
UZA 84



UZA 89



UZA 100



Bijlage 4. De AUC-bepalingen uit de TIC-chromatogrammen van het finale Multiplex-experiment van 14-3-3 Proteïne epsilon in alle gemeten stalen. De chromatogrammen voor de endogene kanalen wordt getoond.

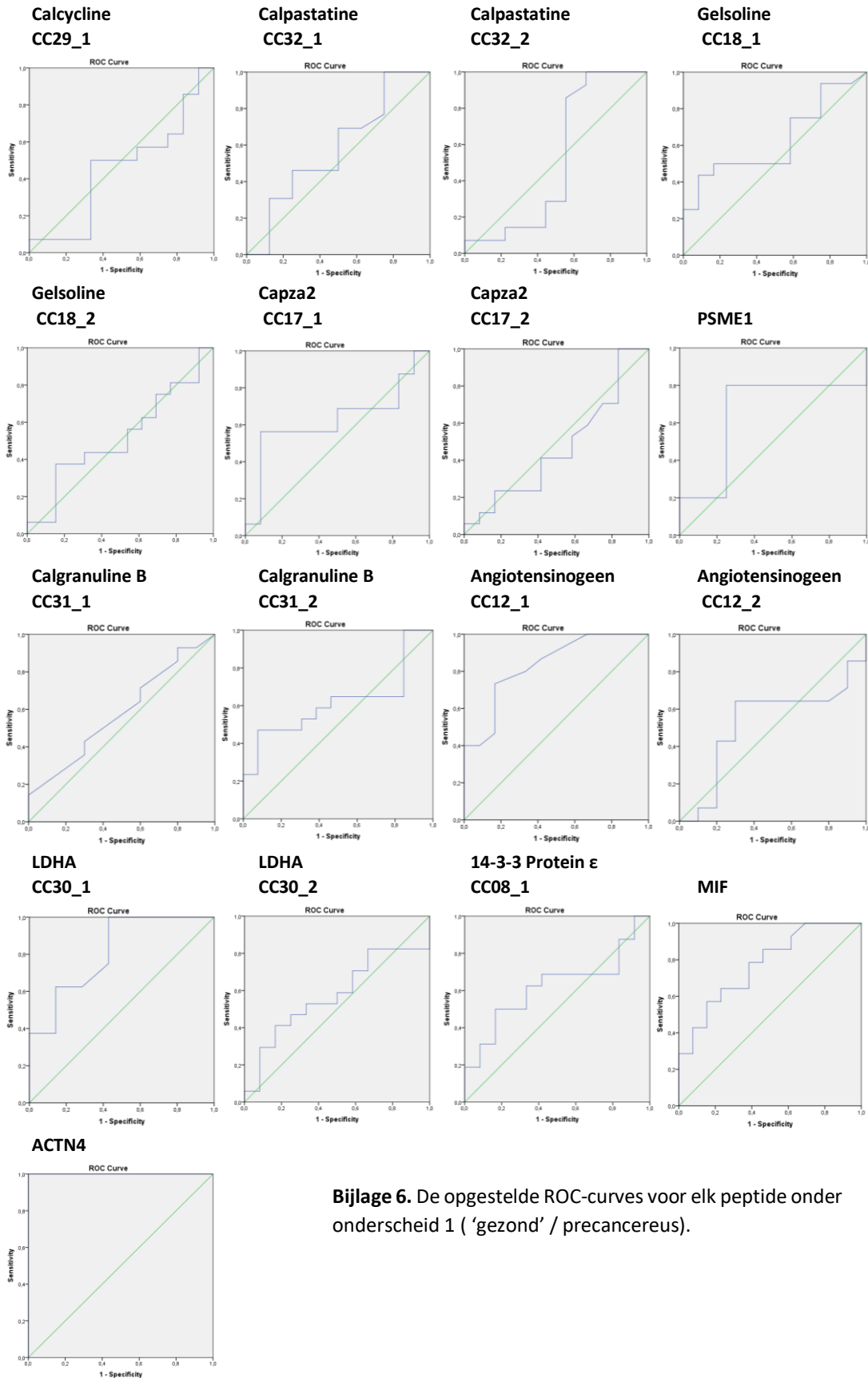
5 Bijlage: Resultaten concentraties (pg/mg) Multiplex experiment

Staal	Conditie	CALCYCLINE (S100A6)		CALPASTATINE		GELSOLINE		F-actin Capping Protein Subunit alfa-2		PSME1
		CC29_1	CC29_2	CC32_1	CC32_2	CC18_1	CC18_2	CC17_1	CC17_2	PSME1_2
GEZOND										
14	Gezond + HIV	689,879	0,000	0,000	/	3374,182	2784,718	1239959,666	4020,430	/
23	Gezond + HPV	0,000	0,000	0,000	0,000	331,053	624,308	4752501,962	951,558	/
26	Gezond + HPV	1245,615	0,000	314,682	0,000	2393,073	372,231	970778,505	5190,327	/
37	Gezond	9088,010	83248,948	373,685	/	13318,084	5978,954	375182,241	236,656	/
44	Gezond	6360,589	0,000	7473,693	199,298	4770,534	1151,502	486088,285	5035,219	192,249
47	Gezond	4697,750	0,000	/	/	0,000	1553,852	545286,756	3203,912	/
54	Gezond	916,634	0,000	84,211	5381,059	3678,032	2007,220	1197536,496	2370,740	/
62	Gezond	16655,658	0,000	/	1062,925	4819,037	903,795	1175152,802	3198,931	410,455
72	Gezond + HPV	1024,964	0,000	1328,656	523,158	64,198	385,739	1120927,432	2102,189	/
74	Gezond	318,029	399577,095	/	398,597	2424,556	6726,323	462354,861	10887,990	353,436
81	Gezond + bloed	498,246	0,000	498,246	/	3900,566	1511,919	251440,822	6018,125	955,541
83	Gezond + HPV	543,541	0,000	46,170	239,158	7884,887	2793,088	567833,628	1975,861	/
LSIL										
34	LSIL + HIV	346,606	0,000	267,216	0,000	14020,250	3275,096	1351698,664	6988,772	/
61	LSIL	1494,739	0,000	288,142	326,125	1039,004	321,018	2421341,133	1852,145	/
71	LSIL + HIV	730,761	0,000	/	/	11835,889	3552,712	1524168,605	2659,586	/
75	LSIL	0,000	0,000	295,257	64,637	6761,563	854,136	788956,513	5655,050	/
79	LSIL	23915,816	0,000	35873,724	/	2491,231	0,000	/	203284,439	29894,770
86	LSIL	3165,329	0,000	583,313	358,737	551,056	4018,641	307603,206	2141,961	/
88	LSIL	1708,273	0,000	96,435	1304,499	15629,903	540,035	1913265,306	2898,365	/
90	LSIL	519,909	0,000	356,952	170,827	2051,818	2061,708	3673400,565	1529,331	552,967
95	LSIL	169,216	0,000	131,406	2391,582	0,000	1171,135	1521346,431	2187,422	797,194
101	LSIL	202,676	0,000	320,301	956,633	2578,173	123,277	410188,654	1853,041	/
HSIL										
35	HSIL	0,000	0,000	129,977	1793,686	14533,671	270,235	1928933,270	3968,035	/
40	HSIL	0,000	0,000	60,700	531,463	2499,649	4254,256	456244,092	3478,426	/
41	HSIL	2220,754	0,000	0,000	74,737	8314,341	1228,305	709570,414	1075,176	/
78	HSIL	435,713	0,000	79,719	/	0,000	3826,531	1636727,339	3421,337	/
84	HSIL	3587,372	0,000	127,212	199,298	9387,770	854,136	365190,719	2341,409	/
89	HSIL	478,316	0,000	/	249,123	2491,467	1128,105	9117904,974	1148,374	144,944
100	HSIL	3736,846	0,000	129,977	2989,477	35807,659	16539,910	390859,783	5648,135	612,441

Staal	Conditie	CALGRANULINE B		ANGIOTENSINOGEN		LDHA		14-3-3 Protein ε	Cathepsine B	MIF	
		CC31_1	CC31_2	CC12_1	CC12_2	CC30_1	CC30_2	CC08_1	CC14_1	MIF_1	MIF_2
GEZOND											
14	Gezond + HIV	42884,942	110393,234	617,501	1999,612	0,000	50638,347	1147,181	37069515,306	27595,173	1831,226
23	Gezond + HPV	22847,159	31289,860	522,293	1052,791	0,000	4727,358	1144,164	99649,235	0,000	2821,285
26	Gezond + HPV	45249,812	43666,519	0,000	1239,667	0,000	9435,347	2085,131	0,000	45991,954	0,000
37	Gezond	76977,161	187596,221	2434,180	7984,986	8363,418	40201,837	3331,685	/	/	49001,826
44	Gezond	78862,898	17908,526	11334,510	822,996	0,000	126445,235	9234,419	386873,499	/	1919,407
47	Gezond	0,000	22668,035	1389,243	/	0,000	6388,471	3,568	/	43483,302	953,581
54	Gezond	11893,569	302364,249	3384,023	4159,886	1913,793	26242,693	1043,944	8370535,714	/	810,706
62	Gezond	0,000	126857,808	0,000	3132,099	/	80288,812	476,049	/	/	5923,422
72	Gezond + HPV	0,000	84,211	527,710	/	/	5719,000	1211,796	/	27595,173	194,754
74	Gezond	82,185	58522,971	3060,525	1816,926	2784,957	32673,721	1512,893	/	/	5256,223
81	Gezond + bloed	0,000	73455,722	13316,156	1184,330	/	46527,811	9974,236	/	/	9772,054
83	Gezond + HPV	7518,988	135410,678	789,040	1453,522	/	604469,424	3628,873	/	/	5074,974
LSIL											
34	LSIL + HIV	50131,230	194609,094	0,000	3242,205	64056,264	36083,145	2448,035	2220754,373	0,000	24535,150
61	LSIL	6134,252	8114,295	1500,993	29,123	/	1992,985	373,456	/	/	924,104
71	LSIL + HIV	27374,962	345300,008	4364,200	5373,028	6626,549	103635,204	1772,980	597895,408	/	6266,892
75	LSIL	74,273	208670,884	6511,902	904,016	226,690	170032,256	539,455	/	837053,571	26944,629
79	LSIL	2235,659	126595,705	1399,240	3407,283	/	127316,552	912,546	/	/	1089,063
86	LSIL	/	11957,908	1116071,429	/	/	11957,908	8968,431	/	/	/
88	LSIL	21386,259	92075,893	2391581,633	2657,313	21741,651	112404,337	9300,595	/	/	/
90	LSIL	154600,515	390524,089	1815,931	2681,636	/	17839,485	532,623	/	/	3251,395
95	LSIL	3072,632	308330,063	22168,906	2162,865	/	31735,909	31296,535	/	/	4203,952
101	LSIL	107101,264	59442,935	10744,657	1044,401	3466,060	50005,798	12,998	0,000	/	2344,688
HSIL											
35	HSIL	610360,007	263703,343	4671,058	3608,748	519,909	63850,968	/	/	/	7645,220
40	HSIL	841,076	2391,582	3728,109	443,681	0,000	29020,923	3878,984	/	/	/
41	HSIL	/	17082,726	1860119,048	/	/	771,478	55803,571	/	/	0,000
78	HSIL	45168,518	206121,909	0,000	3224,236	1966,357	1146191,493	9315,780	4099854,227	/	5650,841
84	HSIL	/	14376,361	51990,905	1049,740	/	137953,428	4699,002	/	298947,704	/
89	HSIL	3208,219	10118,230	398596,939	/	13286,565	1839,678	59789,541	/	/	59789,541
100	HSIL	156084,664	403564,959	9836,117	4120,436	/	140523,897	2930,451	/	/	72818,306

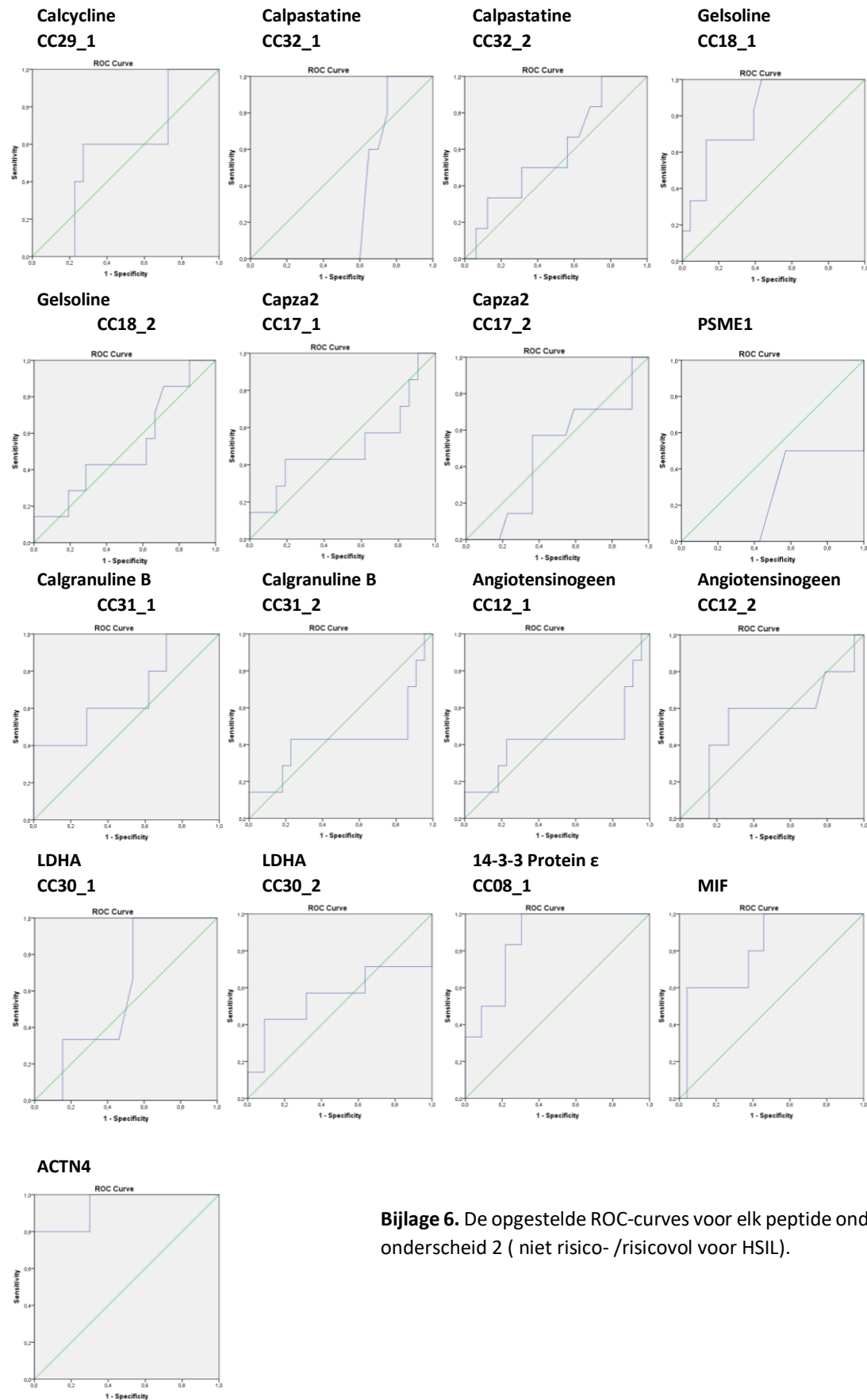
6 ROC-curves

6.1 Onderscheid 1: gezond versus precancereus (LSIL + HSIL)



Bijlage 6. De opgestelde ROC-curves voor elk peptide onder onderscheid 1 ('gezond' / precancereus).

6.2 Onderscheid 2: Risicovol versus niet risicovol voor HSIL



Bijlage 6. De opgestelde ROC-curves voor elk peptide onder onderscheid 2 (niet risico- /risicovol voor HSIL).

