

Protein biomarkers in chronic disease : proteomics-driven discovery

Citation for published version (APA):

Pulinx, B. (2012). *Protein biomarkers in chronic disease : proteomics-driven discovery*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20121003bp>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20121003bp](https://doi.org/10.26481/dis.20121003bp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Clinical proteomics is a scientific discipline that identifies proteins associated with a disease by means of their altered levels of expression between the healthy control and disease state. These protein signatures or biomarkers can be used as a diagnostic or prognostic marker or as an indicator of the response to a certain treatment. Furthermore, biomarkers can attribute to the development of new therapeutics and can help to elucidate both physiological and pathological processes. Various proteomic technologies are suitable to discover and identify differentially expressed proteins, which could represent new potential biomarkers. These technologies can be roughly divided into gel-based and mass spectrometry-based approaches.

The aim of this thesis was to detect and identify potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm (AAA), multiple sclerosis, and viability of transplantable kidneys. To do so, the combination two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) was used. Furthermore, AAA biomarkers identified on pathophysiological grounds, were measured in a large patient cohort to evaluate their usefulness as markers of aneurysm size, progression and success of surgical AAA repair.

In *Chapter 1* we discussed the approach employed to detect and identify potential biomarkers, and the subsequent steps necessary to successfully implement new biomarkers into routine clinical practice. Furthermore, background information on the three clinical problems (i.e., abdominal aortic aneurysm, multiple sclerosis, and viability of transplantable kidneys) is summarized in this chapter.

Abdominal aortic aneurysm, defined as an enlargement of the abdominal aorta with a diameter of 30 mm or more, is the tenth leading cause of death in the Western world. If left untreated, an AAA will increase in size until rupture of the aortic wall occurs, causing a life-threatening haemorrhage. Aneurysm size is fairly good in prospectively predicting aneurysm progression; consequently biomarkers associated with aneurysm size are promising indicators of aneurysm progression. In *Chapter 2* we concluded that HDL-cholesterol, CRP and IgG concentrations are potentially valuable markers for prediction of aneurysm

progression. Thorough validation of these and other serum/plasma markers in a large prospective standardized follow-up study showed that patients with elevated total cholesterol and LDL concentrations at baseline have an increased AAA growth rate. However, aneurysm size remained the most accurate predictor of aneurysm progression (*Chapter 3*).

To find new and improved serological markers for prediction of aneurysm progression, a non-hypothesis driven strategy using 2D-DIGE was employed in *Chapter 5*. The differentially expressed proteins found in serum of patients are involved in several key processes of AAA pathophysiology, such as inflammation, extracellular matrix remodelling, coagulation and fibrinolysis. The differential expression of three proteins (i.e., IgG, α 1-antitrypsin and Factor XII activity) was validated and these proteins showed strong correlation with aneurysm size. However, combination of either α 1-antitrypsin or Factor XII activity measurements with aneurysm size had little effect on prediction of aneurysm progression versus diameter alone.

Surgical repair of an abdominal aortic aneurysm is indicated when aneurysm exceeds 55 mm in diameter and can be accomplished by elective open surgery or endovascular aneurysm repair (EVAR). EVAR has decreased early mortality and length of hospital stay, but requires long term imaging surveillance for detection of stent graft related complication such as endoleak. Computed tomography angiography is considered the gold standard for detection of complications, but has known disadvantages. Therefore, a less harmful and cheaper alternative for post-operative follow-up is desirable. We showed in *Chapter 4* that plasma MMP-9 concentration is able to detect endoleak with high sensitivity (i.e., 100%) and specificity (i.e., 96%). The clinical applicability of this assay will be validated in a prospective clinical trial.

In *Chapter 6* we detected and identified - using 2D-DIGE and tandem mass spectrometry - differentially expressed proteins in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis, patients with clinically isolated syndrome or patients who were diagnosed not to have a neurological disease (i.e., controls). Higher IgG concentration was found in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients compared to both controls and patients with clinically isolated syndrome. Furthermore, an increased amount of asialotransferrin was found in cerebrospinal fluid of both patients with multiple sclerosis or clinically isolated syndrome compared to controls. This observation suggests that alteration in N-glycosylation of cerebrospinal fluid proteins could be associated with pathogenesis of neurological diseases and could be useful in diagnostics.

The study described in *Chapter 7* aims at finding biomarkers indicative of graft viability in the preservation solution from machine-perfused human donor kidneys. Such viability markers could identify donor kidneys with a low risk of early graft failure and prevent transplantation of kidneys that will never regain function. Using 2D-DIGE and tandem mass spectrometry, nineteen unique proteins were identified that were derived both from renal tissue and from

residual plasma in the renal vasculature. Lower haptoglobin concentrations in the perfusion solution were associated with more extensive ischemic injury, indicating decreased viability of donor kidneys. However, further investigation is required to evaluate the potential of haptoglobin in assessing donor kidney viability.

Finally, the major findings of this thesis and the encountered challenges in clinical proteomics are discussed in *Chapter 8*, which also contains directions for future research.

Samenvatting

Clinical proteomics is een tak van de wetenschap die zich focust op de identificatie van ziektegeassocieerde eiwitten, met name door een veranderd expressie niveau tussen ziek en de gezonde controle. Deze eiwit signaturen of biomerkers kunnen gebruikt worden als diagnostische of prognostische merkers, of zelfs als een indicator van de reactie op een bepaalde therapie. Daarnaast kunnen biomerkers bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën, alsook aan de ontrafeling van zowel fysiologische als pathologische processen. Verscheidene proteomics technologieën zijn geschikt voor de ontdekking en identificatie van eiwitten met een differentiële expressie, mogelijk nieuwe potentiële biomerkers. In grote lijnen kan men deze proteomics technologieën opsplitsen in gel-gebaseerde technieken en technieken gebaseerd op massa spectrometrie.

Deze thesis richtte zich op de detectie en identificatie van potentiële biomerkers voor aneurysmata van de abdominale aorta (AAA), multiple sclerose, en de viabiliteit van nieren die getransplanteerd worden. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de combinatie tweedimensionale differentiële in-gel elektroforese (2D-DIGE) en matrix-assisted laser desorptie/ionisatie time-of-flight tandem massa spectrometrie (MALDI-TOF/TOF). Daarnaast werd de expressie van AAA biomerkers, geïdentificeerd op pathofysiologische basis, geanalyseerd in een groot patiëntencohort, om zo hun bruikbaarheid als merkers voor aneurysma grootte, groei en succes van een bepaalde chirurgisch ingreep aan het AAA te evalueren.

In *Hoofdstuk 1* werd de gebruikte strategie voor de detectie en identificatie van potentiële biomerkers bediscussieerd, alsook de daaropvolgende stappen die nodig zijn om nieuwe biomerkers met succes te implementeren in routine klinische praktijken. Tevens wordt er dieper ingegaan op de drie klinische problemen (i.e. aneurysmata van de abdominale aorta, multiple sclerose en de viabiliteit van nieren die getransplanteerd worden).

Vergroting van de abdominale aorta met een diameter van 30 mm of meer wordt gedefinieerd als AAA. Deze aneurysmata zijn de 10^e belangrijkste oorzaak van overlijden in de westerse wereld. Wanneer een AAA niet behandeld wordt, zal ze toenemen in grootte totdat de aortawand ruptuureert en zo een levensbedreigende bloeding veroorzaakt. Op basis van de

grootte van een aneurysma kan men prospectief redelijk goed de progressie van het aneurysma voorspellen; dus biomerkers geassocieerd met de aneurysma grootte zijn veelbelovende indicatoren van aneurysma progressie. In *Hoofdstuk 2* concludeerden we dat HDL-cholesterol, CRP en IgG concentraties potentiële merkers zijn voor het voorspellen van aneurysma progressie. Grondige validatie van deze en andere serum/plasma merkers in een grote prospectieve gestandaardiseerde follow-up studie toonde aan dat patiënten die bij de start een verhoogde totale cholesterol en LDL concentratie hadden, het aneurysma sneller groeide. Desalniettemin blijft de grootte van het aneurysma de meest accurate voorspeller van aneurysma groei (*Hoofdstuk 3*).

Om nieuwe en betere serologische merkers te vinden voor het voorspellen van aneurysma groei, werd 2D-DIGE gebruikt (*Hoofdstuk 5*). De eiwitten met differentiële expressie in het serum van de AAA patiënten zijn betrokken bij verschillende processen van de AAA pathofysiologie, zoals inflammatie, hermodelleren van de extracellulaire matrix, stolling en fibrinolyse. De differentiële expressie van drie eiwitten (i.e. IgG, α 1-antitrypsine en Factor XII activiteit) werd gevalideerd; en deze eiwitten vertoonden een sterke relatie met de grootte van een aneurysma. Toch had de combinatie aneurysma grootte en enerzijds α 1-antitrypsine metingen en anderzijds Factor XII activiteit metingen weinig additief effect op het voorspellen van aneurysma progressie vergeleken met de voorspellingen enkel gebaseerd op de aneurysma grootte.

Chirurgisch herstel van een aneurysma van de abdominale aorta is aangewezen wanneer de diameter van het aneurysma groter is dan 55 mm. Chirurgisch herstel kan gebeuren door middel van een electieve open chirurgische ingreep of door een endovasculaire ingreep (EVAR). De endovasculaire ingreep vertoont een verminderde mortaliteit en verminderde hospitalisatieduur, maar vereist wel herhaaldelijke beeldvorming gedurende een lange tijd. Dit om complicaties gerelateerd aan de stent op te sporen zoals endolekkage. Computed tomografie angiografie wordt beschouwd als de gouden standaard voor het opsporen van complicaties, maar er zijn ook enkele nadelen aan verbonden. Daarom is er nood aan een minder schadelijk en goedkoper alternatief voor de post-operatieve follow-up. In *Hoofdstuk 4* toonden we aan dat de MMP-9 concentratie in het plasma een endolekkage met een hoge sensitiviteit (i.e., 100%) en specificiteit (i.e., 96%) kan opsporen. De klinische toepasbaarheid van deze test zal gevalideerd worden in een prospectieve klinische trial.

In *Hoofdstuk 6*, detecteerden en identificeerden we, door middel van 2D-DIGE en tandem massa spectrometrie, eiwitten met een differentiële expressie in het cerebrospinaal vocht van patiënten met multiple sclerose, patiënten met clinically isolated syndrome of patiënten die geen neurologische aandoeningen hadden (i.e., controles). Hogere IgG concentraties werden gevonden in het cerebrospinaal vocht van patiënten met multiple sclerose vergeleken met zowel de concentraties in het cerebrospinaal vocht van controles en patiënten met clinically

isolated syndrome. Daarenboven, werd er meer asialotransferrine gevonden in het cerebrospinaal vocht van zowel patiënten met multiple sclerose als patiënten met clinically isolated syndrome vergeleken met controles. Deze observatie suggereert dat veranderingen in de N-glycosylatie van eiwitten in het cerebrospinaal vocht gerelateerd kunnen zijn met de pathogenese van neurologische aandoeningen en dus ook bruikbaar kunnen zijn in de diagnostiek.

De studie beschreven in Hoofdstuk 7 richt zich op het zoeken naar biomerkers in de perfusie oplossing van humane donornieren, geperfuseerd door een machine, die indicatief zijn voor de viabiliteit van transplantaten. Zulke merkers kunnen donornieren identificeren met een laag risico op early graft failure en kunnen de transplantatie van nieren voorkomen die nooit hun functie herwinnen. 2D-DIGE en tandem massa spectrometrie identificeerden negentien unieke eiwitten die hun oorsprong vinden in zowel het nierweefsel als het resterende plasma in de nier vasculatuur. Lagere haptoglobine concentratie in de perfusie oplossing is geassocieerd met een meer uitgebreide ischemische schade, wat wijst op een verlaagde viabiliteit van de donornieren. Doch is verder onderzoek nodig om het potentieel van haptoglobine als merker voor viabiliteit verder te analyseren.

Tot slot, worden de belangrijkste bevindingen van deze thesis en de tegengekomen hindernissen van clinical proteomics bediscussieert in Hoofdstuk 8. Daarnaast worden ook enkele richtlijnen geven voor verder onderzoek.