



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Metabolomics, peptidomics and glycoproteomics studies on human schistosomiasis mansoni

Balog, C.I.A.

Citation

Balog, C. I. A. (2010, November 30). *Metabolomics, peptidomics and glycoproteomics studies on human schistosomiasis mansoni*. Department of Parasitology, Faculty of Medicine / Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16188>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16188>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SUMMARY
SAMENVATTING
ACKNOWLEDGEMENTS
CURRICULUM VITAE
PUBLICATION LIST

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000



SUMMARY

Schistosomiasis is, after malaria, the second-most socio-economically devastating parasitic disease. It has been estimated that 600 million people in many parts of Africa, the Middle East and Southern America (mainly Brazil) are at risk of infection. Of these, 200 million are chronically infected (World Health Organization, www.who.int). The disease is contracted by contact with contaminated freshwater. Schistosomes have a complex life cycle, requiring adaptation for survival in fresh water as free-living forms and as parasites in snail intermediate hosts, and vertebrate definitive hosts. Free-swimming cercariae are released from snails in the water, then penetrate the skin of the definitive host whilst shedding their tails, and transform into schistosomula. In the course of 4 to 6 weeks, the schistosomula migrate via the blood circulation and become adult male or female worms. In the case of *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), the paired male and female worms can live in the mesenteric venules for many years. Female worms may lay several hundred eggs per day which migrate through the intestinal wall and are voided in faeces (approx. 50%) to eventually continue the life cycle or are taken by the blood flow and become lodged primarily in the liver. Here, they provoke eosinophilic inflammatory and granulomatous reactions, which are progressively replaced by fibrotic deposits, damaging the overall function and integrity of the liver and thereby causing most of the morbidity associated with schistosomiasis.

In the first part of the general introduction (**Chapter 1**), the reader is introduced to human schistosomiasis. The parasite life cycle (figure 1, **Chapter 1**), distribution, pathology and morbidity, control and treatment are outlined. In addition this part of the introduction contains information on the current diagnostic methods. Importantly, most of the current diagnostic methods have been developed to monitor infection, either directly or indirectly. However, the identification of highly sensitive and specific markers, other than antibodies, associated with the disease and with the host response in relation to an actual infection is still needed. Therefore, the major part of this thesis concerns global urinary peptidomic and metabolomic approaches that may provide new insights into the host parasite interaction and might improve the monitoring of *Schistosoma*-infection and morbidity.

The concept of biomarker discovery is explained in the second part of the general introduction. The biomarker discovery studies within this thesis were all performed using urine. Urine is a preferred biofluids due to its ease of collection and extensive history of use in clinical analysis and diagnostics. Initial studies examining the peptide content of urine have described fragments of a wide range of proteins, and have indicated that urine would be a potentially rich source of peptide markers. At the same time, urine is a rich source of metabolites. Metabonomics is increasingly being applied to investigate (mechanisms of) diseases in humans. The concepts of urinary peptidomics and urinary metabonomics and the technologies involved are described

in the second part of the introduction. In addition, this part of the introduction depicts the successful application of these technologies in other urinary biomarker discovery studies. This chapter ends by giving a brief insight into the data processing and data analysis, essential components of the biomarker discovery workflow.

Chapter 2 describes a global urinary peptidomic analysis which may be applied in biomarker discovery studies. The purpose of this study was to develop a generally applicable, rapid and robust method for screening large numbers of urine samples resulting in a broad spectrum of native peptides. This workflow may be applied in biomarker discovery studies. Peptides from the urine samples were trapped, desalted, pH normalized and fractionated on a miniaturized automatic reversed phase–strong cation exchange (RP-SCX) cartridge system. Eluted peptides were analyzed by MALDI-ToF(-ToF), MALDI-FT-ICR and LC-ESI-ion trap mass spectrometry. Bovine serum albumin (BSA) digests and urine samples were used to determine qualitative and quantitative reproducibility of the system and robustness of the method. A selected set of urine samples from *Schistosoma haematobium*-infected individuals was used to evaluate clinical applicability. As a proof of principle, hemoglobin-derived peptides were identified in urine samples from *S. haematobium*-infected individuals, even when the microhaematuria test was negative. The developed method is quick and robust, circumvents time-consuming purification steps, and allows automated handling of urine samples within clinical studies. Importantly, since there is sufficient material available after the fractionation, the method makes it possible to reanalyze samples with different mass spectrometers, thus leading to a higher chance of a positive identification of potential biomarkers.

In **Chapter 3**, the method described in **Chapter 2** has been applied to 164 urine samples collected in a rural area in Uganda, near Lake Victoria, with a high prevalence of *S. mansoni*. ClinPro Tools™ (CPT) software and the Discrete Wavelet Transformation–Support Vector Machine (DWT-SVM) procedure were used for classification and statistical analysis. A large difference in urinary peptide profiles between children and adults was noticed, but classification based on infection was only possible for children. In the external validation dataset, 93% of the infected children were classified correctly with DWT-SVM (vs. 76% for CPT). In addition 91% of low-infected children were classified correctly using DWT-SVM (vs. 85% for CPT). The discriminating peptides were identified as fragments of collagen 1A1 and 1A3, and uromodulin. This chapter demonstrates the usefulness of a peptidomics profiling approach combined with DWT-SVM in the monitoring of *S. mansoni* infection.

In **Chapter 4**, urine samples from the same cohort (mentioned in **Chapter 3**) were used for a global NMR-based metabolomics analysis. From the 447 individuals included in the cohort, urine samples were collected at five time-points, before and after chemotherapy (one or two treatments) with Praziquantel. Using a combination

1

2

3

4

5

6

7



of unsupervised and supervised multivariate statistical analysis of the generated 1-D NMR spectra it was possible to discriminate infected from uninfected individuals in two age groups (children and adults) based on differences in their urinary profiles. The underlying molecular markers of *S. mansoni* infection were found to be primarily linked to changes in gut microflora, energy metabolism and liver function. These findings are in agreement with data from earlier studies on *S. mansoni* infection in animal models and thus provide corroborating evidence for the existence of a metabolic response specific for this infection.

Thus far, chapters present global biomarker discovery approaches, however for a more targeted approach related to schistosomiasis, glycoconjugates constitute an interesting class of compounds (**Chapter 1**). A large part of the antibodies produced by infected subjects are directed against glycan epitopes of such schistosome glycoconjugates. Glycan and glycoconjugate antigens such as the worm gut-associated CAA (circulating anodic antigen) and CCA (circulating cathodic antigen) are released in the circulation of the host and form the basis for one of the methods for the diagnosis of *Schistosoma* infection, using a sandwich immunoassay with anti-carbohydrate monoclonal antibodies. In addition, it has recently been demonstrated that urine of infected individuals contains free glycans secreted by the eggs. The search for a specific class of biomarkers such as parasite-derived glycopeptides may be facilitated by the structural information of the glycans attached to the egg secreted glycoproteins. In **Chapter 5**, the glycosylation of IPSE/alpha-1, a major secretory egg antigen from *S. mansoni* that triggers IL-4 production in human basophils, has been investigated by mass spectrometric analysis of tryptic glycopeptides. Nano-scale LC-ESI ion trap MS(/MS) and MALDI-TOF(/TOF)-MS studies before and after enzymatic digestions showed that monomeric IPSE/alpha-1 contains two N-glycosylation sites, which are each occupied to a large extent with core-difucosylated diantennary glycans that carry one or more Lewis X motifs. Lewis X has been reported as a major immunogenic glycan element of schistosomes and this is the first report on the expression of Lewis X on a specific schistosome egg protein.

Chapter 6 describes a comprehensive mass spectrometric analysis of urine samples with the aim of identifying specific glycopeptides in urines of *S. mansoni*-infected individuals. As mentioned above, glycoconjugates derived from the parasite have been shown to play an important role in many aspects of schistosomiasis and some of them are present in the circulation of the host. A heterogeneous population of novel aberrantly O-glycosylated peptides derived from the C-terminus of human Apolipoprotein C-III (Apo C-III) were characterized in urine of *S. mansoni*-infected individuals which were not detected in urine of non-infected controls. The glycan composition of these glycopeptides is completely different from what has been described previously for Apo C-III. Most importantly, these glycopeptides lack sialylation and display a high

degree of fucosylation. This study exemplifies the potential of mass spectrometry for the identification and characterization of O-glycopeptides, without prior knowledge of either the glycan or the peptide sequence. Furthermore, the results presented in **Chapter 6** indicate for the first time that as a result of *S. mansoni* infection, the glycosylation of a host protein is altered.

The closing chapter of this thesis, **Chapter 7**, contains a general discussion which places the individual chapters into the context of biomarker discovery studies and *S. mansoni*. The presented study is the first in which mass spectrometry and NMR are used for the analysis of a cohort of human *S. mansoni*-infected individuals with the aim of identifying markers associated with infection and/or morbidity. This has resulted in the identification of a number of novel markers, which are probably related to the host rather than to the parasite, and potentially constitute morbidity markers. Nevertheless, further studies are needed to evaluate the overall applicability of these putative biomarkers and how they are involved in the complex human-parasite interaction.

1

2

3

4

5

6

7



SAMENVATTING

Schistosomiasis is, na malaria, de meest voorkomende parasitaire ziekte ter wereld. Naar schatting 600 miljoen mensen in vele delen van Afrika, het Midden-Oosten en Zuid-Amerika en dan vooral in Brazilië, lopen een hoog risico op infectie. Ongeveer 200 miljoen mensen lijden onder een chronische infectie (World Health Organization, www.who.int). Schistosomen hebben een complexe levenscyclus. Ze zijn aangepast om te overleven in zoet water als vrij-levende organismen (cercariae) en als parasieten in de tussengastheer (de slak) en de definitieve gastheer (de mens). Het vrijzwemmende miracidium infecteert de tussengastheer (de slak) en drie tot zeven weken later komen uit de slak duizenden vrijzwemmende cercariën met een gevorkte staart. De besmetting van de mens vindt plaats door contact met geïnfecteerd water. De cercariën penetreren de intacte huid van de definitieve gastheer en terwijl ze hun staart afwerpen transformeren ze zich in schistosomula. In de loop van ongeveer 4 tot 6 weken, migreren de schistosomula via de bloedcirculatie naar de poortaderen bij de lever en worden daar volwassen mannelijke of vrouwelijke wormen. In het geval van *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), leven mannelijke en vrouwelijke wormen voor vele jaren gepaard in de poortaderen. Vrouwelijke wormen leggen circa 300 eieren per dag. Ongeveer de helft van de eieren verlaat het lichaam via de ontlasting om de levenscyclus voort te zetten en de rest van de eieren wordt meegenomen door de bloedstroom. Deze eindigen voornamelijk in de lever of darmen waar zij ontstekingen veroorzaken. Rond deze eieren ontstaat granulatieweefsel dat geleidelijk wordt vervangen door bindweefsel. Als gevolg hiervan treedt een beschadiging van de algemene werking en structuur van de lever op en zien we dus het grootste deel van de morbiditeit geassocieerd met schistosomiasis. **Hoofdstuk 1** geeft een algemene inleiding over schistosomiasis in de mens. Er worden verschillende aspecten van de parasiet en van de infectie besproken, zoals de levenscyclus (figuur 1, hoofdstuk 1), het leefgebied van de parasiet, de pathologie en morbiditeit als gevolg van de infectie, de controle en de behandeling van de infectie. Verder worden in dit deel van de inleiding de huidige diagnosemethoden besproken. De meeste van de huidige diagnostische methoden zijn ontwikkeld om de infectie direct of indirect aan te tonen. Echter, de identificatie van gevoelige en specifieke markers, andere dan antilichamen, geassocieerd met de ziekte en met de gastheerrespons, in relatie tot een huidige infectie, is nog steeds belangrijk. In het grootste deel van dit proefschrift worden daarom nieuwe benaderingen gepresenteerd, zoals peptidomics en metabolomics, die kunnen leiden tot nieuwe inzichten in de interactie tussen de parasiet en de gastheer en kunnen bijdragen aan de verbetering van de detectie van *Schistosoma* infecties en de gerelateerde morbiditeit.

De benadering voor het vinden van biomarkers (biomarker discovery) wordt uitgelegd in het tweede deel van de algemene inleiding. Alle biomarker studies in dit proefschrift zijn uitgevoerd met urine als onderzoeksmateriaal. Urine is een favoriete

lichaamsvloeistof, omdat het gemakkelijk te verzamelen is en omdat urine een lange geschiedenis van gebruik in klinische analyse en diagnose heeft. In eerdere studies is beschreven dat urine heel veel peptiden bevat die afkomstig zijn van een breed scala aan eiwitten. Als gevolg hiervan wordt verwacht dat de urine een potentieel rijke bron van peptidemarkers is. Tegelijkertijd is urine een rijke bron van metabolieten. Metabonomics wordt steeds meer toegepast om ziekten en mechanismen van ziekten bij de mens te onderzoeken. Het concept van urine peptidomics en urine metabonomics en de technologieën die worden toegepast in de peptidomic en metabolomic studies wordt beschreven in het tweede deel van de inleiding. Bovendien benadrukt dit deel van de introductie de succesvolle toepassing van deze technologieën in andere biomarker studies waar urine als onderzoeksmateriaal wordt gebruikt. Dit hoofdstuk eindigt met het geven van een korte toelichting op de verwerking van gegevens en data-analyse, essentiële onderdelen van de biomarker studies.

Hoofdstuk 2 beschrijft een nieuwe geautomatiseerde workflow voor het uitvoeren van een urine peptidomic analyse. Het doel van deze studie was om een algemeen toepasbare, snelle en robuuste methode te ontwikkelen voor het screenen van de peptiden, aanwezig in grote aantallen in de urine monsters. De peptiden, aanwezig in urine, zijn geëxtraheerd, ontzout, pH genormaliseerd en gefractioneerd op een geminiaturiseerde, automatische “reverse phase”-strong cation exchange (RP-SCX) cartridge systeem. Vervolgens werden de geëluëerde peptiden geanalyseerd met MALDI-TOF (-TOF), FT-ICR en LC-iontrap massaspectrometrie. Een standaard digest van Bovine Serum Albumine (BSA) en urinemonsters werden gebruikt om de kwalitatieve en kwantitatieve reproduceerbaarheid van het systeem en de robuustheid van de methode te bepalen. Een geselecteerde set van urinemonsters van *Schistosoma haematobium*-geïnfecteerde individuen werd gebruikt om de klinische toepasbaarheid te evalueren. In de urinemonsters van *S. haematobium*-geïnfecteerde individuen werden hemoglobine afgeleide peptiden geïdentificeerd, zelfs wanneer de initiële microhematuria test (aantonen van bloed in urine) negatief was. De ontwikkelde methode is snel en robuust, omzeilt tijdrovende zuiveringsstappen en faciliteert geautomatiseerde verwerking van urinemonsters in klinische studies. De methode maakt het mogelijk om monsters met verschillende massa spectrometers opnieuw te analyseren omdat er, na de fractionering, voldoende materiaal beschikbaar is. Deze additionele analyses leiden tot een hogere kans op een positieve identificatie van potentiële biomarkers.

In **hoofdstuk 3** is de methode, zoals beschreven in **hoofdstuk 2**, toegepast op een groot aantal urinemonsters. Deze urinemonsters zijn verzameld in een landelijk gebied in Oeganda in de buurt van het Victoriameer, een regio met een hoge prevalentie van *S. mansoni*. De ClinPro Tools™ (CPT) software en de Discrete Wavelet Transformation-Support Vector Machine (SVM-DWT) procedure zijn gebruikt voor de classificatie en

1

2

3

4

5

6

7

&V

statistische analyse. De profielen van de peptiden aanwezig in de urine van volwassenen verschillen significant van de urine peptidenprofielen van kinderen. Daarom werden voor de verdere analyse de urine peptidenprofielen van de twee groepen apart vergeleken. De analyse van de groep volwassenen heeft helaas niet geresulteerd in een significant verschil tussen de geïnfecteerde en niet geïnfecteerde volwassenen. De analyse van de urine peptidenprofielen van de groep kinderen heeft geresulteerd in discriminatie van de geïnfecteerde en niet geïnfecteerde kinderen. In de externe validatie dataset, zijn 93% van de geïnfecteerde kinderen correct geclassificeerd met DWT-SVM (versus 76% met CPT). Hetzelfde model werd verder gebruikt om de kinderen met een lichte infectie te onderscheiden van niet geïnfecteerde kinderen. Bovendien is 91% van de kinderen met een lichte infectie correct geclassificeerd met behulp van DWT-SVM (vs 85% met CPT). De discriminerende peptiden zijn geïdentificeerd als fragmenten van collageen 1A1 en 1A3 en uromodulin. Dit hoofdstuk geeft het voordeel van een peptidomics aanpak gecombineerd met de DWT-SVM statistische analyse weer, voor het aantonen van *S. mansoni* infectie.

In **hoofdstuk 4**, zijn 447 urinemonsters uit de cohort, beschreven in hoofdstuk 3, gebruikt voor een globale NMR metabonomics analyse. De urinemonsters zijn verzameld tijdens de veldstudie op vijf verschillende tijdstippen, voor en na (een of twee keer) de behandeling met Praziquantel. Met behulp van een combinatie van “unsupervised” en “supervised” multivariate statistical analysis van de gegenereerde 1-D NMR spectra, was het mogelijk de niet-geïnfecteerde en geïnfecteerde personen van de twee leeftijdsgroepen (kinderen en volwassenen) te onderscheiden op basis van verschillen in hun urineprofielen. De onderliggende moleculaire markers van *S. mansoni* infecties bleken vooral verband te houden met veranderingen in de microflora van het maagdarmkanaal, energiemetabolisme en de leverfunctie. Deze bevindingen zijn in overeenstemming met gegevens uit eerdere studies, uitgevoerd met muizen, geïnfecteerd met *S. mansoni*. Er kon geconcludeerd worden dat, als gevolg van *S. mansoni* infectie, een verandering op metabolisch niveau plaats vindt.

Voor een wat gericht onderzoek naar biomarkers gerelateerd aan schistosomiasis, kunnen de glycoconjugaten een interessante klasse van verbindingen (Hoofdstuk 1) zijn. Een groot deel van de antilichamen, geproduceerd door geïnfecteerde personen, is gericht tegen koolhydraat-epitopen van dergelijke schistosomale glycoconjugaten. Koolhydraten en glycoconjugaten antigenen, zoals CAA (circulerende anodische antigeen) en CCA (circulerende kathodische antigeen) worden door de wormen uitgescheiden in de circulatie van de gastheer en vormen de basis voor een van de methoden voor de diagnose van *Schistosoma*-infectie. Deze methode is gebaseerd op sandwich immunoassay met anti-koolhydraten monoklonale antilichamen. Bovendien is recentelijk aangetoond dat de urine van geïnfecteerde individuen vrije koolhydraten bevat, die uitgescheiden worden door de eieren. Hoofdstuk 5 beschrijft de analyse

van de glycosylering van IPSE/alpha-1, een belangrijke secretorische ei-antigeen van *S. mansoni* dat IL-4 productie in de menselijke basofielen triggert. Nano- LC-MS (/ MS) en MALDI-TOF (/ TOF)-MS-studies in combinatie met enzymatische degradatie, laten zien dat monomere IPSE/alpha-1 twee N-glycosylering sites bevat. Deze sites zijn voor een groot deel bezet met biantennaire structuren met een verschillend aantal Lewis X elementen en met een digefucosyleerd core. Lewis X is een belangrijk epitope van de immunogene glycanen van de schistosomen. Dit is het eerste verslag over de expressie van Lewis X op een specifiek ei-eiwit van de schistosome. De zoektocht naar een specifieke klasse van biomarkers, zoals glycopeptiden, afkomstig van de parasiet, kan worden vergemakkelijkt door de structurele informatie over de glycanen van de eiwitten die uitgescheiden worden door de eieren. **Hoofdstuk 6** beschrijft een uitgebreide massaspectrometrische analyse van urinemonsters met als doel het identificeren van specifieke glycopeptiden in de urine van *S. mansoni* geïnfecteerde individuen. Zoals hierboven vermeld, spelen glycoconjugaten, afgeleid van de parasiet, een belangrijke rol in vele aspecten van schistosomiasis en sommige van hen zijn aanwezig in de circulatie van de gastheer.

Een heterogene populatie van afwijkend O-geglycosyleerde peptiden, afkomstig van de C-terminus van de menselijke Apolipoproteïne C-III (apo C-III) is aangetoond in de urine van *S. mansoni* geïnfecteerde personen en niet in de urine van niet geïnfecteerde personen. De samenstelling van het glycaan van deze glycopeptiden is volledig verschillend van wat eerder is beschreven voor apo C-III. Belangrijker nog, deze glycopeptiden missen sialylering en worden gekarakteriseerd door een hoge mate van fucosylering.

Deze studie illustreert het potentieel van massaspectrometrie voor de identificatie en karakterisering van O-glycopeptiden, zonder voorafgaande kennis van het glycaan of de peptide sequentie. Bovendien is, met deze resultaten, voor het eerst bewezen dat de glycosylering van een gastheer-eiwit is veranderd als gevolg van *S. mansoni* infectie. Het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, **hoofdstuk 7**, bevat een algemene discussie waarin de afzonderlijke hoofdstukken worden samengevoegd met als rode draad de biomarkers studies en *S. mansoni*. De gepresenteerde studie is de eerste waarin massaspectrometrie en NMR worden gebruikt voor de analyse van een cohort van menselijke *S. mansoni* geïnfecteerde individuen, met het doel markers, gerelateerd aan de infectie en morbiditeit, te identificeren. Het onderzoek heeft geresulteerd in de identificatie van een aantal nieuwe markers, die waarschijnlijk morbiditeitsmarkers zijn. Toch is er verder onderzoek nodig om de algemene toepasbaarheid van deze potentiële biomarkers en hun betrokkenheid bij de complexe interactie tussen de gastheer en de parasiet te evalueren.

1

2

3

4

5

6

7

&V

DANKWOORD

Lang heb ik uitgekeken naar het moment waarop ik klaar zou zijn om een dankwoord te schrijven. En hier ligt het dan, mijn proefschrift! Ik dacht wel goed te weten wie ik ging bedanken en op welke wijze. Het afronden van een proefschrift is bepaald geen individuele ervaring en een dankwoord aan diegenen die een belangrijke bijdrage geleverd hebben is vanzelfsprekend. Bij mijn vierde zin merk ik echter al dat mijn prozaïsche kwaliteiten beperkt zijn. Zonder de illusie te hebben volledig te kunnen zijn en voor iedereen de juiste woorden te hebben gevonden, wil ik op voorhand graag iedereen bedanken die ik hierna ten onrechte ben vergeten. Vervolgens wil ik graag een aantal mensen bij name noemen en bedanken voor hun grote en waardevolle bijdrage aan de totstandkoming van dit proefschrift.

Allereerst zou ik graag, voor mijn promotor, de wel verdiende woorden van dank in een paar compacte zinnen willen uitdrukken, maar dit blijkt het allermoeilijkste van dit proefschrift. Beste André, u bent mijn wetenschappelijke vader, mijn grootste voorbeeld en mijn inspiratie!

Mijn co-promotor, Oleg, wil ik ook graag bedanken voor zijn ondersteuning en begeleiding tijdens de afgelopen jaren. Ook al waren we het niet altijd met elkaar eens, onze samenwerking heeft geresulteerd in een prachtig proefschrift! Bedankt!

Mijn dank gaat verder uit naar de co-auteurs van publicaties die in dit proefschrift zijn opgenomen. Hun constructieve opmerkingen waren van groot belang en hebben zeker bijgedragen aan de kwaliteit van dit werk.

In de voorbijaande jaren heb ik de collegialiteit en de gezelligheid op de afdeling Parasitologie mogen ervaren. Ik wil dan ook alle collega's bedanken voor hun hulp en de zeer leerzame en plezierige tijd. Met mijn vragen en mijn verhalen was ik bij mijn kamergenoten altijd welkom. Alex, Axel, Aswin, Emrys, Liam, Oleg, Rawi, Rob en Sibel, wanneer jullie dit dankwoord zullen lezen ben ik hoogstwaarschijnlijk al naar de glyco-kamer verhuisd. Ik zal jullie directe aanwezigheid missen, maar ik kom graag koffie met jullie drinken. Ook de andere medewerkers van de afdeling wil ik bedanken voor hun inzet, de interesse die ze altijd toonden in mijn onderzoek en de stimulerende woorden om me een hart onder de riem te steken. Dus bij dezen, in alfabetische volgorde: Alegria, Cees, Cynthia, Dieuwke, Gerhild, Hans, Hannah, Janneke, Jean-Marc, Katja M., Katja N., Magnus, Manfred, Manu, Marco, Maurice, Moniek, Ralf, Rene, Renee, Ron, Simone, Tiziana, Yuri.

Verder bedank ik Alexandra voor haar interesse en goede raad, Carolien en Irina voor al hun LC en massaspectrometrische hulp en Bart, die voornamelijk in het begin van het project een grote steun is geweest. Caroline wil ik graag bedanken voor haar onmisbare ondersteuning, haar optimisme en punctualiteit en voor het altijd vinden van een gaatje in een drukke agenda. Jantien bedank ik voor haar betrokkenheid en interesse.

Beste Dorien, het was ontzettend prettig om de laatste loodjes van het promotietraject te kunnen delen met iemand in hetzelfde schuitje, bedankt daarvoor en ik hoop dat ik ook voor jou ben geweest wat jij voor mij was.

Rico, mijn collega en kamergenoot, bedank ik hartelijk voor al zijn hulp en gezelligheid! Hij was altijd bereid om te helpen en geen vraag was hem te veel.

Verder wil graag Manfred bedanken voor zijn ondersteuning en betrokkenheid. Beste Manfred, ik ben blij om een onderdeel van de glycogroep te kunnen zijn en ik verheug me op de interessante projecten die we in de toekomst tot een goed einde zullen brengen.

Paul ben ik in bijzonder dankbaar! Zijn enthousiasme, deskundigheid en betrokkenheid hebben mij veel geleerd! Zijn kritische correcties en zinvolle suggesties maken zijn bijdrage aan de totstandkoming van dit proefschrift bijzonder groot en waardevol.

Ook kennissen, vrienden en familie wil ik niet ongenoemd laten. Zij zorgden voor de nodige afleiding en ontspanning. Uiteraard wil ik graag mijn schoonmoeder bedanken voor haar interesse en steun en het feit dat ze er altijd is wanneer het nodig is.

Lieve Edit, onze vriendschap gaat zo ver terug dat je een soort familie voor mij bent geworden. Je mensenkennis, interesse en niet te vergeten diepgaande gesprekken tijdens onze wandelingen op het strand, zorgden altijd voor een nieuwe kijk op het leven en nieuwe impulsen.

Andy, bedankt voor het kritisch lezen van sommige stukjes. Je begint steeds meer over massaspectrometrie en schistosomiasis te begrijpen. Vanaf nu is er weer wat meer tijd en ik streef niet meer naar een remise, het schaakbord mag weer op tafel.

Soms leer je via je werk mensen kennen waarmee je een band opbouwt waaruit een vriendschap ontstaat die blijft, ook nadat ze een andere baan hebben gevonden. Ioana, sinds de eerste dag dat je op onze afdeling kwam werken, klikte het tussen ons. Ik ben dan ook heel blij dat je mijn paranimf wilt zijn.

Lieve Natalie, mijn vriendin en mijn tennismaatje, heel leuk dat je mijn paranimf wilt zijn. Je uitstekende organisatorische vermogen en je nauwkeurige planning hebben er voor gezorgd dat je mijn agenda beter kende dan ikzelf. Veel afspraken die ik nagekomen ben, heb ik aan je te danken.

Liefste Leonardo en Louise, ik heb getracht om jullie niet te veel nadelen van dit proefschrift te laten ondervinden. Hoewel ik dit niet alleen voor jullie deed, hoop ik dat jullie het later wel zullen waarderen. Als ik jullie na een lange en moeilijke dag weer zag, wist ik dat alles goed zou komen.

Lieve Leo, het schrijven van dit proefschrift was niet alleen voor mij een beproeving. Mijn lange avonden en stress hebben veel geduld en medeleven van je gevraagd. Bedankt voor je onvoorwaardelijke steun!

1

2

3

4

5

6

7



Draga mami iti multumesc pentru toate sfaturile bune si pentru increderea pe care o ai in mine. Draga Cristi, chiar daca ne despart sute de km, tu esti intotdeauna aproape atuni cind am nevoie de tine. Draga tati, nu am devenit medic asa cum ai sperat dumneata dar am devenit doctor. Daca linga lumea noastra mai exista o lume imateriala, sper sa ma vezi si sa fii mandru de mine.