

*Karakteriseren van de metabolische wijzigingen  
na inductie van geneesmiddelenresistentie bij  
Leishmania donovani*

Door:

**Bart Cuypers**

*Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad:*

**Master in de Biologie, cel- en systeembio**

Promotor: Prof. Dr. Jean-Claude Dujardin

Copromotor: Dr. Maya Berg

m.m.v. Dr. Manu Vanaerschot

Onderzoeksgroep Moleculaire Parasitologie

Instituut voor Tropische Geneeskunde

Nationalestraat 155

2000 Antwerpen

## Inhoud

Dankwoord .....	IV
Afkortingenlijst .....	V
Summary .....	1
1 Samenvatting.....	2
2 Inleiding .....	3
2.1 Leishmania.....	4
2.1.1 Taxonomie .....	4
2.1.2 Levenscyclus (Subgenus <i>Leishmania</i> ) .....	4
2.1.3 Overleving in de vertebrate gastheer : manipulatie en defensie.....	6
2.2 Leishmaniasis.....	9
2.3 Behandeling van leishmaniasis.....	10
2.3.1 Antimonials .....	11
2.3.2 Amfotericine B.....	13
2.3.3 Miltefosine.....	15
2.3.4 Paromomycine.....	16
2.3.5 Combinatietherapie.....	17
3 Materiaal en methoden .....	19
3.1 Gebruikte stammen, hun resistentieprofiel en cultivatie .....	19
3.2 Extractie metabolieten .....	21
3.3 Kwantificatie van het percentage metacyclische parasieten.....	22
3.4 HILIC chromatografie gekoppeld aan Orbitrap Exactive massaspectrometrie .....	23
3.4.1 HILIC chromatografie.....	23
3.4.2 Orbitrap Massaspectrometrie .....	24
3.5 Metaboliet Identificatie.....	25
3.6 QSSR .....	27
3.7 Fold Inductions .....	27

3.8	Kwaliteitscontrole en data-exploratie .....	28
3.9	Biomerkers voor resistentie .....	29
3.10	Verdere data-analyse .....	29
4	Resultaten.....	30
4.1	Kwaliteitscontrole.....	30
4.2	Metabolietklassen .....	30
4.3	Exploratie dataset.....	31
4.4	Venndiagrammen .....	33
4.5	Kwantificatie van het percentage metacyclische parasieten.....	34
4.6	Biomerkerstudie .....	34
4.7	Bevindingen door manuele inspectie van de data.....	35
4.7.1	Individuele geneesmiddelen en hun combinaties.....	36
4.7.2	Pathways .....	37
5	Discussie .....	39
5.1	Metabolische patronen die gelinkt kunnen worden aan één bepaald geneesmiddel.....	40
5.1.1	Trivalente Antimonialen .....	40
5.1.2	Amfotericine B.....	41
5.1.3	Miltefosine.....	42
5.1.4	Paromomycine.....	43
5.2	Mechanismen die gedeeld worden tussen geneesmiddelen.....	43
5.2.1	Beschermen aromatische aminozuren en indool-acrylaat tegen oxidatieve stress in AMB-R, SB-R en hun combinatie? .....	43
5.2.2	Proline, een veelzijdige metaboliet in <i>Leishmania</i> .....	45
5.2.3	Acylglycines .....	46
5.3	Geneesmiddel combinaties.....	46
5.4	Metacyclogenese.....	48
5.5	Besluit .....	48
5.6	Toekomstperspectief.....	50

6	Referenties .....	51
7	Bijlagen .....	61
8.1	Figuren.....	62
8.2	Tabellen.....	81

## Dankwoord

Op zoek naar een masterthesis, stuurde ik op donderdag 19 mei 2011 om 9u44 vol spanning een mailtje naar enkele professoren, die onderzoek doen dat bij mijn wetenschappelijke interesses aanleunt. Mijn verbazing was echter groot toen ik nog geen 3 minuten later reeds antwoord kreeg van Prof. Dujardin met de woorden “We hebben steeds open topics voor een MSc voor gemotiveerde mensen”. Er volgde snel een afspraak en daar gaf hij me een spoedcursus ‘*Leishmania*’. Ik was onmiddellijk verkocht voor het onderwerp.

Bedankt prof. Dujardin, om mij deze kans te geven. Uw deur stond ook altijd open voor vragen en uw biologische standpunt heeft ervoor gezorgd dat de discussie van deze thesis veel sterker in zijn schoenen staat.

Bedankt Maya en Manu, voor jullie absoluut schitterende begeleiding en nog meer voor de fijne mensen die jullie zijn om mee samen te werken. Ik niet alleen een heleboel technieken van jullie geleerd, maar ook veel andere zaken die belangrijk zijn voor een wetenschapper zoals correct rapporteren en communicatie.

Bedankt ook aan alle mensen van de vakgroep parasitologie voor de fantastische werksfeer.

Bedankt Prof. Guisez en Prof. Knapen, voor jullie constructieve commentaar op deel 1 van de thesis zodat ik dit in rekening kon brengen voor deel 2.

## Afkortingenlijst

ACR2	arsenaat reductase 2
AMB(-R)	amfotericine B(-resistent)
AQP1	aquaglyceroporine 1
BR	biologisch replicaat
CTP	cytoplasmatisch tryparedoxin peroxidase
cTXN	cytoplasmatisch tryparedoxine
DC	'direct current' of gelijkstroom
EF-1 $\alpha$	elongation factor-1 $\alpha$
(H)ESI	(heated) electrospray ionisation
FI	Fold Induction (zie M&M)
FL	flagellengte gedeeld door parasietlengte
GalNAc	N-acetylgalactosamine
GPC	glycerofosfocholine
GPE	glycerofosfoethanolamine
GPL	glycerofosfolipide
GSH/GSSG	gereduceerd / geoxideerd glutathion
HiFBS	heat inactivated fetal bovine serum
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
IL-	interleukine
JAK	janus kinase
LC-MS	liquid chromatography - mass spectrometry
LD <sub>50</sub>	concentratie waarbij 50% van de parasieten sterft ('lethal dose for 50%')
LPG	lipofosfoglycaan
LW	oppervlakte van de parasiet
MAC	membrane attack complex
MARCKS	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MHC-II	major histocompatibility complex II
MIL(-R)	miltefosine(-resistent)
MS	massaspectrometer
MTP	mitochondriaal tryparedoxine peroxidase
mTXN	mitochondriaal tryparedoxine

ODC	ornithine decarboxylase
PKC	protein kinase C
PKDL	post-kala azar dermal leishmaniasis
PMM(-R)	paromomycine (-resistent)
ppm	Parts per million
Prx	2-Cys-peroxiredoxin
PSG	promastigote secretory gel
PTPIB	protein tyrosine phosphatase 1B
Px	glutathion peroxidase
QSRR	quantitative structure retention relationships
RF	radiofrequentie
ROS	reactive oxygen species
SAM	S-adenosyl-L-methionine
Sb <sup>III</sup>	trivalent antimoniaal
Sb <sup>V</sup>	pentavalent antimoniaal
SB(-R)	Antimoniaal(-resistent)
SHP-1	src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase-1
SPS	spermidine synthase
SSG	natrium stibogluconaat
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCPTP	T cell protein tyrosine phosphatase
TDR1	thiol afhankelijk reductase 1
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
T <sub>H</sub> 1/ T <sub>H</sub> 2	T-helper 1/ T-helper 2
TIC	'Total ion count'
TR	trypanothion reductase
TS <sub>2</sub>	trypanothion disulfide
TXN	tryparedoxine
ZIC	zwitterionisch
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -glutamylcysteine synthetase

## Summary

*Leishmania donovani* is the causative agent of visceral leishmaniasis in East-Africa and the Indian subcontinent. The disease is most commonly cured by antimonials (SB), miltefosine (MIL), paromomycin (PMM) or amphotericin B (AMB). However, widespread drug-resistance against SB in Nepal, reports on isolated cases with AMB-resistant parasites and increased treatment failure of miltefosine are very disturbing since there are no new drugs in the pipeline. Even more, the actions of the current drugs and mechanisms of resistance are poorly understood. For this reason, we studied the metabolome of drug-pressured Ethiopian *L. donovani* promastigotes with induced resistance to the separate drugs and combinations. The profile of 266 metabolites was characterized by ZIC-HILIC coupled to Orbitrap Exactive mass spectrometry. SB-resistant parasites showed increased fatty acid concentrations, possibly linked to the inhibitory effect of SB on  $\beta$ -oxidation or to the production of glycerophospholipids. In the MIL-resistant line, there was a striking increase of lysophosphatidylcholines, possibly related to the fact that MIL is a substrate analogue of phospholipid producing enzymes. Interestingly, one of these - GPC(O-14:0/1) – was only present in parasites exposed and resistant to MIL. The AMB-resistant line showed major alterations in glycerophospholipid metabolism, probably linked to the fact that AMB interacts with the membrane component ergosterol. Another series of glycerophospholipids correlated strongly with PMM-resistance. None of these mechanisms showed an additive effect in the combinations, but the metabolic profile of the parasites resistant to AMB, SB and their combination showed significant overlap. Metabolite increases were found in the thiol-, indoolacrylate- and proline pathway that are implicated in the protection against oxidative stress, a known action mechanism of both drugs. Some of these findings corresponded to known information, clearly showing the value of *in vitro* induced resistance and supporting the role of metabolomics as a useful tool for studying drug resistance.



# 1 Samenvatting

*Leishmania donovani* is de verwekker van viscerale leishmaniasis in Oost-Afrika en het Indiase subcontinent. De ziekte wordt meestal bestrijd met antimonialen (SB), miltefosine (MIL), paromomycine (PMM) of amfotericine B (AMB). De wijdverspreide resistentie tegen SB in Nepal, geïsoleerde gevallen van AMB-resistentie en een toegenomen behandelingsfalen van MIL zijn echter zeer verontrustend wanneer in acht wordt genomen dat er momenteel geen nieuwe geneesmiddelen tegen leishmaniasis in ontwikkeling zijn. Bovendien is er weinig geweten over de actiemechanismen van de huidige geneesmiddelen en resistentie hiertegen. Daarom werd in dit onderzoek het metabooloom van Ethiopische *L. donovani* promastigoten met geïnduceerde resistentie tegen al deze geneesmiddelen en combinaties bestudeerd. Hierbij stonden de parasieten onder geneesmiddelendruk. 266 Metabolieten werden gekarakteriseerd door ZIC-HILIC gekoppeld aan Orbitrap Exactive massaspectrometrie. SB-resistente parasieten vertoonden verhoogde vetzuurconcentraties, mogelijk gelinkt met het inhibitorisch effect van SB op de  $\beta$ -oxidatie of de productie van glycerofosfolipiden. In de MIL-resistente lijn was er een opvallende toename van lysofosfatidylcholines, mogelijk gerelateerd aan het feit dat MIL een substraatanaalogue is van de biosynthese-enzymen van fosfolipiden. Interessant was ook dat één van deze - GPC(O-14:0/1) – enkel aanwezig was in parasieten die onder MIL-druk gecultiveerd werden en dus MIL-resistent zijn. De AMB-resistente stam vertoonde grote veranderingen in het glycerofosfolipidemetabolisme, waarschijnlijk gelinkt aan het feit dat AMB interageert met de membraancomponent ergosterol. Een andere reeks glycerofosfolipiden correleerde sterk met PMM-resistentie. Geen van deze mechanismen was additief in de combinaties. Het profiel van de parasieten resistent tegen AMB, SB en hun combinatie vertoonde wel significante overlap. Toenames in metabolietconcentraties werden gevonden in de thiol- indoolacrylaat- en prolinepathway, die geassocieerd zijn met de bescherming tegen oxidatieve stress, een bekend actiemechanisme van beide geneesmiddelen. Sommige van deze bevindingen kwamen overeen met gekende feiten, wat duidelijk de waarde van *in vitro* experimenten en metabolomics ondersteunt, als een interessante manier om geneesmiddelenresistentie te bestuderen.

## 2 Inleiding

*Leishmania* is een genus van protozoaire parasieten dat een probleem vormt voor de volksgezondheid in 88 landen op 4 continenten (**fig. B1 en B2**) (WHO, 2010). De parasiet veroorzaakt leishmaniasis, een zeer diverse aandoening die jaarlijks 1.6 miljoen mensen treft (WHO, 2010). Het ziektebeeld varieert van zelfhelende ulci bij cutane leishmaniasis tot fatale viscerale leishmaniasis (Aït-Oudhia et al., 2011). Deze laatste wordt ook kala azar genoemd, het Hindi voor 'zwarte koorts', wat refereert naar de kenmerkende zwartkleuring van de huid en de koorts die gepaard gaan met deze vorm van leishmaniasis in een vergevorderd stadium. Voor zijn verspreiding is *Leishmania* afhankelijk van zijn vector: diptera van de subfamilie Phlebotominae (zandvliegen).

Momenteel worden vier soorten geneesmiddelen courant gebruikt om leishmaniasis te behandelen: antimonialen, paromomycine, amfotericine B en miltefosine. Tegen antimonialen duikt echter steeds meer therapiefalen op: wereldwijd is dit gemiddeld 5 %, maar lokaal kan dit oplopen tot 65% (in Bihar, India) (Croft et al., 2006; Rijal et al., 2003). Bovendien toont recent onderzoek op *Leishmania donovani* uit Nepal aan dat resistente stammen een hogere *in vivo* overleving hebben in afwezigheid van het geneesmiddel, wat mogelijk de verspreiding van deze stammen in de hand kan werken (Vanaerschot et al., 2011). Ook de orale toediening van miltefosine zou op korte termijn resistentie van de parasiet in de hand kunnen werken (Mondal et al., 2010). Dit is erg verontrustend nieuws wanneer in acht genomen wordt dat er momenteel geen nieuwe geneesmiddelen tegen leishmaniasis in ontwikkeling zijn. Inzicht in de potentiële resistentiemechanismen tegen de huidige geneesmiddelen is dus van essentieel belang om verantwoorde keuzes te kunnen maken inzake geneesmiddelengebruik en om gerichte strategieën te ontwikkelen voor geneesmiddelenonderzoek. Hoewel het dus in de eerste plaats een biologisch vraagstuk is, heeft de kennis over deze mechanismen een grote potentiële toepasbaarheid.

Het doel van deze studie is om metabolomics te exploreren als middel voor het karakteriseren van Ethiopische *L. donovani* stammen met *in vitro* geïnduceerde resistentie tegen de geneesmiddelen amfotericine B, miltefosine, paromomycine, trivalente antimonialen en hun combinaties. Momenteel bestaat er weinig inzicht in de actiemechanismen van deze geneesmiddelen en ook resistentie tegen antimonialen is slecht begrepen. Eerder dan één welbepaald mechanisme te ontrafelen, wil deze studie juist een veelheid aan pathways afschrijven naar interessante wijzigingen t.o.v. niet-resistente parasieten. Bovendien zal er worden nagegaan of resistentie tegen de combinaties het resultaat is van een additief effect van enkelvoudige resistentie tegen de 2 geneesmiddelen op zich, of niet. Met deze informatie zal vervolgens een veelheid aan hypothesen gegenereerd worden die verder onderzoek naar geneesmiddelenwerking- en resistentie in de juiste richting kunnen sturen. Een

dergelijke vergelijkende metabolomics-studie van *Leishmania* stammen vereist de simultane kwantificatie en identificatie van een groot aantal intracellulaire metabolieten. Een methodologie werd reeds ontwikkeld voor dit doel en laat toe om intracellulaire *Leishmania* metabolieten te karakteriseren met behulp van HILIC (hydrophilic interaction chromatography) gekoppeld aan Orbitrap Exactive massaspectrometrie (T'Kindt et al., 2010). De volledige methodologie bestaat uit 4 stappen: *Leishmania* metaboliet extractie, data collectie op LC-MS, data analyse met het softwarepakket 'R' en identificatie van de metabolieten aan de hand van verscheidene databases.

## 2.1 *Leishmania*

### 2.1.1 Taxonomie

*Leishmania* behoort tot de Classis van de Kinetoplastida die gekenmerkt worden door de aanwezigheid van één enkel mitochondrion, waarbinnen zich een schijfachtige structuur bevindt: de kinetoplast. Die bestaat uit mitochondriaal DNA dat in dit geval kinetoplast DNA of kDNA wordt genoemd omwille van zijn uitzonderlijke structuur.  $5 \cdot 10^3$ - $10^4$  minicirkels (~2.5kb) en 20-50 maxicirkels (~37kb) zijn namelijk aaneengeschakeld tot een complex netwerk van DNA (Pérez-Morga & Englund, 1993). Kinetoplastida bezitten ook een glycosoom. Dit is een organel dat structureel sterk op een peroxisoom lijkt, maar glycolytische enzymen bevat (Parsons, 2004). In het cytoplasma vindt er in tegenstelling tot de meeste organismen geen glycolyse plaats.

Naast *Leishmania* bevat de familie van de Trypanosomatidae ook nog de bekende pathogenen *Trypanosoma brucei* (slaapziekte) en *Trypanosoma cruzi* (ziekte van Chagas).

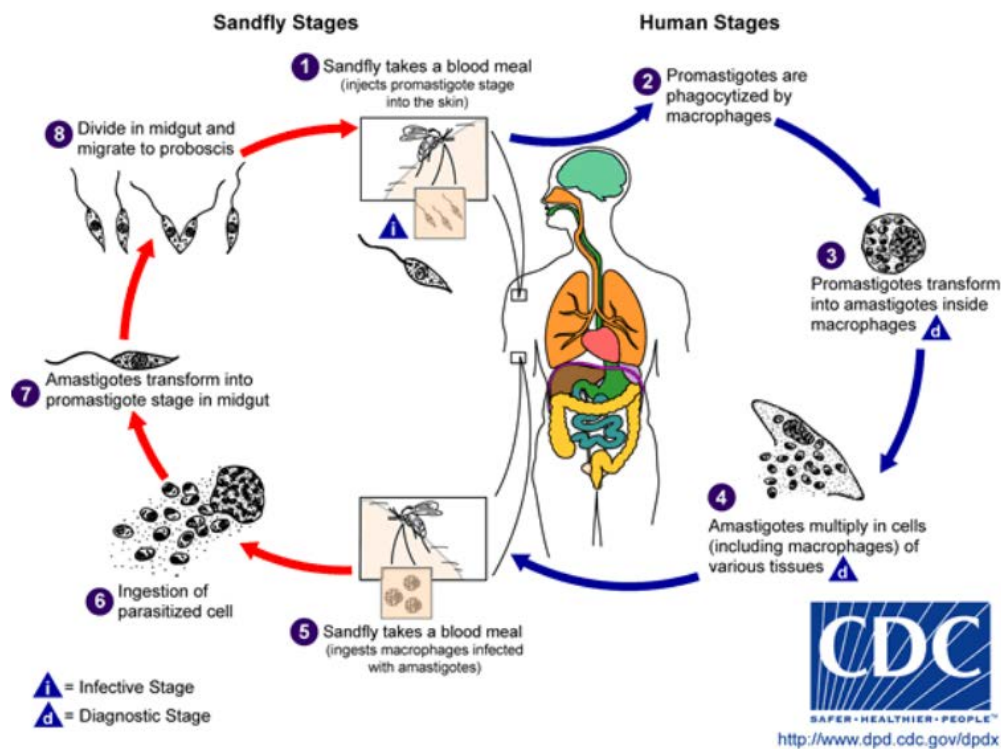
De diversiteit binnen het genus *Leishmania* wordt weergegeven in **figuur B3**. Deze classificatie werd opgesteld door rekening te houden met immunologische, genetische en biochemische data (Bañuls et al., 2007). Het genus wordt onderverdeeld in twee subgenera naargelang de plaats van voorkomen in de ingewanden van de vector; de subgeni *Leishmania* en *Vianna*. Enkel *Vianna* maakt een deel van zijn ontwikkeling door in de epigaster (achterste deel van het spijsverteringskanaal) van de zandvlieg (Mosser & Brittingham, 1997).

### 2.1.2 Levenscyclus (Subgenus *Leishmania*)

*Leishmania* wordt overgedragen door zandvliegen (fam. Phlebotominae) van het geslacht *Lutzomyia* in de Nieuwe Wereld en van het geslacht *Phlebotomus* in de Oude Wereld. De levenscyclus staat weergegeven in **figuur 1**.

Wanneer een zandvlieg de vertebrate gastheer bijt, dan zal deze samen met zijn bloedmaaltijd amastigoten opnemen. Dit zijn ronde, niet geflagelleerde cellen die zich enkel in de vertebrate gastheer ontwikkelen. Ze bevinden zich in de monocytten van het bloed, maar kunnen ook vrijkomen

wanneer geïnfecteerde gastheercellen barsten. De parasieten komen vrij uit de monocyten bij vertering in de zandvlieg.



**Figuur 1:** Levenscyclus *Leishmania* (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Wanneer de parasieten het achterste deel van de middendarm van de zandvlieg bereiken, vormen ze zich om naar korte, geflagelleerde, procyclische promastigoten (Bates & Rogers, 2004). Deze vorm van de parasiet deelt zeer sterk en zorgt voor een sterke stijging van de parasietpopulatie. De bloedmaaltijd met parasieten wordt initieel omsloten door een peritrofe matrix die bestaat uit chitinefibrillen, proteïnen en glycoproteïnen die gesecreteerd worden door het middendarmepitheel (Bates & Rogers, 2004). Hierbinnen deelt de parasiet gedurende 2-5 dagen waarna hij zich omvormt naar een nectomonade promastigoot (Bates & Rogers, 2004). Deze vorm heeft migratie als functie en wordt daarom gekenmerkt door een veel langer cellichaam, een veel langere flagel en een arrest van celdeling. Door de productie van chitinasen kan hij ontsnappen uit de peritrofe matrix langs de anterieure kant ervan (Schlein et al., 1991; Shakarian & Dwyer, 2000). Deze nectomonade promastigoten zullen zich met de flagel vasthechten tussen de microvilli van de middendarm om niet geëxcreteerd te worden samen met de bloedmaaltijd, maar ze zullen ook migreren richting thoracale middendarm. De infectie zal zich dus naar de voorkant van het spijsverteringskanaal uitbreiden, namelijk naar de voorste middendarm en de valvula cardiaca. Hier ontwikkelen de nectomonade promastigoten zich tot leptomonade promastigoten. Ze onderscheiden zich van de vorigen doordat hun cellichaam maar half zo lang is (6-8µm) en doordat ze terug intensief delen (Bates & Rogers, 2004). Bovendien secreteren ze een gelachtige substantie, de 'promastigote secretory gel' of PSG

(Bates & Rogers, 2004). Deze is van essentieel belang voor de transmissie. De gel vormt namelijk een prop in het spijsverteringskanaal waardoor de zandvlieg bij het nemen van de volgende bloedmaaltijd genoodzaakt wordt te braken. Hierbij worden infectieuze, metacyclische promastigoten in het bloed van de vertebrate gastheer gebraakt. Dit levensstadium ontwikkelt zich uit de leptomonade promastigoten. Ze zijn smal, zeer mobiel, delen niet meer en kunnen zich niet meer aan het darmepitheel binden, waardoor ze vrij rondzwemmen (Bates & Rogers, 2004).

De metacyclische promastigoten worden vervolgens gefagocyteerd door een macrofaag of een andere mononucleaire fagocyt, waarna ze zich omvormen tot amastigoten. Deze amastigoten omzeilen het immuunsysteem en kunnen zich delen binnen de fagocyt. Ze kunnen ook vrijkomen wanneer de cel barst om vervolgens nieuwe fagocyten te infecteren.

Een belangrijke aanpassing is de aanwezigheid van lipofosfoglycan (LPG). Deze molecule bestaat uit een opeenvolging van disacharide monomeren die verbonden zijn via fosfodiesterbindingen. Ze is gebonden aan fosfatidylinostol in de membraan via een hexasacharide glycankern. De galactosen van de oligosacharide monomeren kunnen zijketens dragen (zoals in *L. major*, maar niet in alle *L. donovani* stammen) (Sacks et al., 1995). LPG komt voor over de volledige oppervlakte van de parasiet (ook de flagel) en verandert gedurende de metacyclo-genese van compositie. Zo is er een verminderde blootstelling van terminale suikers door bijvoorbeeld een vermindering van het aantal zijketens of door het plooiën en clusteren van deze ketens (McConville et al., 1992; Sacks et al., 1995). Doordat deze suikers essentieel zijn voor de vasthechting aan het darmepitheel van de vector, verklaart dit waarom er een verschil in vasthechting tussen procyclische en metacyclische promastigoten is (Sacks et al., 1995).

Afhankelijk van de *Leishmania* soort kan de transmissie **zoönotisch** (circulatie binnen dierlijke gastheren met incidentele infectie van de mens), **anthropo-zoonotisch** (circulatie binnen mens en dier) of **anthroponotisch** (mens als enige vertebrate gastheer) zijn. *L. donovani* werd altijd beschouwd als een anthroponotische soort, maar recentelijk werd ook DNA teruggevonden in het bloed van koeien, buffels en geiten in een Nepalees dorp waar viscerale leishmaniasis (VL) voorkomt (Bhattarai et al., 2010). Verder onderzoek moet nog uitwijzen of deze dieren al dan niet een reservoirfunctie kunnen vervullen.

### 2.1.3 Overleving in de vertebrate gastheer : manipulatie en defensie

*Leishmania* is een meesterlijke manipulator van het immuunsysteem. Hij slaagt er niet enkel in om het te omzeilen, maar is zelfs in staat sommige componenten hiervan in zijn voordeel te gebruiken.

Wanneer *Leishmania* in het bloed terechtkomt zullen onmiddellijk complementproteïnen aan zijn oppervlak binden aangezien ze LPG goed herkennen (Puentes et al., 1988). Dit heeft voor de parasiet als voordeel dat er C3a en C5a gevormd wordt, welke chemoattractantia zijn voor macrofagen. Bovendien wordt het C3 herkend door macrofagen, wat fagocytose bevordert. Ook dit is voordelig aangezien het de toegangsweg tot het intracellulaire milieu is die *Leishmania* gebruikt. Het MAC (membrane attack complex) zorgt normaalgezien voor cellysis, maar dankzij een structuurwijziging in het LPG bij de metacyclogenese is *Leishmania* hiervoor resistent. Er vindt namelijk bijna een verdubbeling plaats van de LPG-lengte door een toename van het aantal disacharide-fosfaat units (McConville et al., 1992). Dit heeft vermoedelijk als gevolg dat het MAC geassembleerd wordt op een relatief grote afstand van de membraan, waardoor de kans op insertie in de plasmamembraan veel kleiner is (Mosser & Brittingham, 1997). Een ander beschermingsmechanisme is het GP63 proteïne dat net zoals LPG in de membraan verankerd zit door koppeling aan fosfatidylinostol. GP63 bezit  $Zn^{2+}$  afhankelijke endopeptidase activiteit en kan C3b omzetten naar een molecule die structureel gelijk op het inactieve iC3b (Bordier et al., 1986; Bouvier et al., 1989; Brittingham & Mosser, 1996). Hierdoor kan C3b niet langer voor de rekrutering van het MAC zorgen.

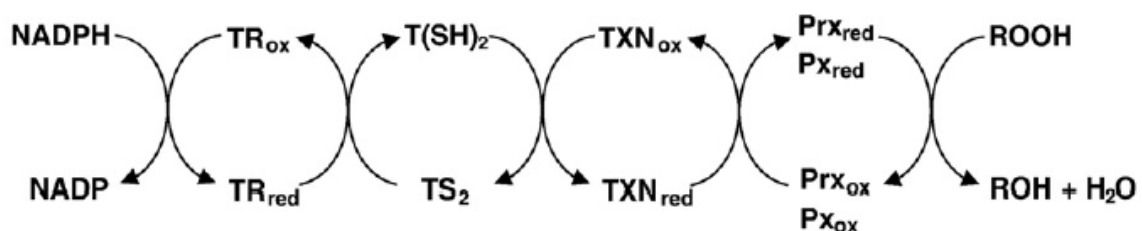
De opname van de parasiet gebeurt via fagocytose door de macrofaag waarbij een innig contact tussen hun membranen plaatsvindt (Chang, 1979). Dit contact wordt verzekerd door zowel rechtstreeks contact van de parasiet (oa. LPG en gp63) met de macrofaag als opsonine gefaciliteerde binding (Handman & Goding, 1985; Mosser & Brittingham, 1997; Russell & Wilhelm, 1986). Normaalgezien fuseert het fagosoom dan met endosomen en lysosomen, die lytische enzymen bevatten, om een fagolysosoom te vormen dat de indringer vernietigt. Het LPG van *Leishmania* inhibeert echter deze fusie, wat de overleving van de parasiet sterk verbetert (Desjardins & Descoteaux, 1997). Het LPG is ook in staat radicalen te neutraliseren en het NADPH oxidase te inhiberen (Bogdan & Rölinghoff, 1998; Lodge et al., 2006). Het NADPH oxidase is de voornaamste bron van 'reactive oxygen species' (ROS) in de macrofaag. Door de verminderde blootstelling en verhoogde resistentie aan radicalen krijgt de parasiet de tijd om zich om te vormen tot de amastigote vorm die nog beter aangepast is aan de gastheer.

De amastigoten hebben verscheidene strategieën om aan de verdediging van de gastheer te ontsnappen. Ten eerste zorgen ze ervoor dat de macrofaag gedeactiveerd wordt. Na infectie met *Leishmania* wordt er een duidelijke concentratievermindering van het activerende cytokine IL-12 waargenomen, terwijl er een toename van anti-inflammatoire cytokines wordt geobserveerd (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4) (Chatelain et al., 1992; Ghalib et al., 1993; Piedrafita et al., 1999; Wilson et al., 1998). Dit zorgt er ook voor dat de adaptieve immunrespons in de richting van de humorale immuniteit ( $T_H2$  cellen en alternatieve macrofaagactivatie) wordt gestuurd i.p.v. de cellulaire ( $T_H1$  met de klassieke

macrofaagactivatie), wat voor het verwijderen van een intracellulair pathogeen zoals *Leishmania* zeer inefficiënt is.

Om deze effecten te verkrijgen, beïnvloedt *Leishmania* verscheidene pathways binnen de macrofaag. Zo heeft men aangetoond dat proteïne kinase C (PKC) geïnhibeerd wordt door LPG, waardoor vermoedelijk fagosoom en lysosoom niet meer met elkaar kunnen versmelten (Bhattarai et al., 2010; Descoteaux & Turco, 2002). Een tweede pathway start bij inhibitie van SHP-I (Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase-1) door GP63, *Leishmania* EF-1 $\alpha$  (elongation factor-1 $\alpha$ ) en het fructose-1,6-bisfosfaat aldolase (Gomez et al., 2009; Nandan & Reiner, 2005; Nandan et al., 2007). Dit leidt tot de negatieve regulatie van JAK/STAT en MAPK pathways, wat resulteert in een inhibitie van verscheidene macrofaagfuncties waaronder NO productie als reactie op IFN- $\gamma$  (Gomez et al., 2009). SHP-I blokkeert bovendien verscheidene TOLL-like receptorpathways (Abu-Dayyeh et al., 2008; Chandra & Naik, 2008).

Trypanosomatidae bezitten bovendien een uniek redoxmetabolisme (**fig. 2**), uitgebreid beschreven door Krauth-Siegel & Comini (2008). Het bestaat uit een redoxketen met als basisreductant NADPH. Dit NADPH kan in deze keten enkel trypanothion disulfide (TS<sub>2</sub>) reduceren via het enzym trypanothion reductase (TR), een molecule die uitsluitend gevonden wordt bij trypanosomatidae. Het bestaat uit 2 glutathion moleculen (GSH/GSSG naargelang respectievelijk gereduceerd of geoxideerd) gekoppeld aan spermidine. Trypanothion kan zijn elektronen doorgeven aan tryparedoxin (TXN) dat op zijn beurt 2-Cys-peroxiredoxin (Prx) kan reduceren of glutathion peroxidasen (Px). Prx kan zo peroxiden onschadelijk maken. Belangrijk om te vermelden is dat er geen glutathion reductasen en thioredoxin reductasen aanwezig zijn waardoor trypanothion en trypanothion reductase de enige link vormen tussen NADPH en de thiol-redoxsystemen.



**Figuur 2:** Het trypanothion gemedieerd waterstofperoxidemetabolisme van de trypanosomatidae. Uitleg zie tekst. TR: Trypanothion reductase, TS<sub>2</sub> : trypanothion disulfide, TXN: tryparedoxin, Prx: 2-Cys-peroxiredoxin, Px: glutathion peroxidase (Krauth-Siegel & Comini, 2008).

## 2.2 Leishmaniasis

Leishmaniasis kan zich naargelang de omstandigheden in de gastheer (immuunrespons en behandeling) of *Leishmania*-soort anders manifesteren.

Bij **cutane leishmaniasis** ontstaat een grote zweer op de plaats van de beet. Hoewel dit vaak vanzelf geneest laat het lelijke littekens achter. Wanneer het individu een slechte cellulaire immuniteit bezit kan hieruit **diffuse cutane leishmaniasis** ontstaan waarbij de zweren zich gaan verspreiden over het lichaam. Dit geneest nooit spontaan.

Hoe **mucocutane leishmaniasis** ontstaat is slecht begrepen. Deze vorm wordt gekenmerkt doordat er na het genezen van primaire cutane laesies, secundaire gaan ontstaan op de oro-nasale en faryngale membranen met ernstige mutilatie van het gezicht als gevolg (Acestor et al., 2006).

Bij **viscerale leishmaniasis** worden specifiek de macrofagen van de lever, de milt en de pancreas getroffen door de parasiet (Mondal et al., 2010). Symptomen zijn koortsaanvallen, spleno- en hepatomegalie en verminderde immuniteit. Deze vorm van de ziekte komt vooral voor in Oost-Afrika en het Indiase subcontinent (*L. donovani*), en Zuid-Amerika en Noord-Afrika (*L. chagasi*) (Mondal et al., 2010). Jaarlijks zorgt viscerale leishmaniasis voor 500 000 nieuwe gevallen en 51 000 doden (Mondal et al., 2010). De eigenlijke ziekte breekt vaak niet (**asymptomatische vorm**) of pas na enkele maanden door (Khalil et al., 2002). Bij doorbraak is dit zonder behandeling bijna altijd dodelijk voor de gastheer. De doodsoorzaak is dan bijna steeds een secundaire infectie die uit de hand loopt omdat *Leishmania* het immuunsysteem van de gastheer onderdrukt. Het belang van de asymptomatische vorm is niet geweten. Deze vorm zou sterk kunnen bijdragen tot de verspreiding van de parasiet aangezien in sommige studies tot 9 asymptomatische geïnfecteerden per symptomatische patiënt gerapporteerd werden (Carneiro et al., 2011; Khalil et al., 2002; Ostyn et al., 2011).

Soms ontstaat na de behandeling van viscerale leishmaniasis - meestal na 0-6 maanden in Sudan en 2-3 jaar in India (Zijlstra et al., 2003) - een toestand die men '**post-kala azar dermal leishmaniasis**' (PKDL) noemt. Hierbij verschijnen laesies op gezicht en rug die variëren van gekleurde vlekjes tot papels. De incidentie van PKDL hangt erg af van het bestudeerde gebied (vb. 5% in Nepal t.o.v. 50-60% in Sudan (Zijlstra et al., 2003)). Deze vorm van de ziekte veroorzaakt weinig overlast voor de gastheer, waardoor deze vorm vaak niet behandeld wordt. Nochtans zijn de concentraties parasieten in de laesies groot waardoor deze mensen wel goede reservoirstadtheren zijn en dus de verspreiding van de parasiet bevorderen (Uranw et al., 2011).



De symptomen van viscerale leishmaniasis zijn weinig specifiek, ze zijn dan ook te verwarren met bijvoorbeeld malaria, schistosomiasis, bacteriële endocarditis, etcetera (Singh, 2006). Bovendien komt regelmatig co-infectie met bijvoorbeeld HIV, malaria, tuberculose, malaria, schistosomiasis of slaapziekte voor (Mondal et al., 2010). Dit maakt dat diagnose van leishmaniasis niet vanzelfsprekend is (Mondal et al., 2010; Singh, 2006; WHO, 2010).

Verscheidene testen werden ontwikkeld om toch uitsluitsel te kunnen geven over een potentiële *Leishmania* – besmetting. Er bestaat een uitgebreid gamma aan **bloedtesten**, maar velen zijn ongeschikt in het veld en allemaal testen ze op de aanwezigheid van antilichamen of antigenen tegen *Leishmania* (Mondal et al., 2010). Een positieve antilichaam test kan echter ook een relict zijn van vorige infecties of het gevolg van kruisreactiviteit met antigenen van andere ziektes. Antigenen en antilichamen kunnen bovendien ook aanwezig zijn bij subklinische concentraties aan parasieten (asymptomatische vorm). Omdat behandelingen tegen leishmaniasis ernstige bijwerkingen tot zelfs de dood (antimonialen) als gevolg kunnen hebben, wordt daarom zelden een bloedtest als enig diagnostisch middel gebruikt. De meest gebruikte bloedtesten zijn de '**indirect immunofluorescence assay test**', '**indirect ELISA**', en '**immunoblotting**', maar dan enkel in gespecialiseerde labo's omdat de procedures gespecialiseerde training en materialen vereisen. De '**rK39-based immunochromatographic test**' is de meest gebruikte methode in het veld. Ze is zeer eenvoudig, snel (10-20min), goedkoop (<1 euro/test) en erg nauwkeurig (specificiteit = 93.9%) (Chappuis et al., 2006). In onderzoekslaboratoria wordt vaak PCR gebruikt, waarbij niet enkel de aanwezigheid, maar ook de *Leishmania* stam bepaald kan worden.

**Microscopische observatie** is zeer lang de meest gebruikte methode geweest en wordt nog steeds standaard gebruikt ter verificatie van de bloedtesten indien gespecialiseerd personeel aanwezig is. Bij microscopische observatie wordt een aspiraat genomen van het beenmerg, een lymfeknoop of de milt. Een Giemsa-kleuring zal vervolgens het cytoplasma van parasiet en macrofaag differentieel kleuren, alsook het aanwezig DNA (nucleus en kinetoplast). Een beenmerg- of lymfeknooppunctie is veel minder pijnlijk en gevaarlijk dan een miltpunctie (in 0.1% van de gevallen fataal), maar de gevoeligheid van de test ligt dan veel lager (53%-86% voor beenmerg, 53%-65% voor de lymfeknoop en >90% voor de milt) (Mondal et al., 2010).

### 2.3 Behandeling van leishmaniasis

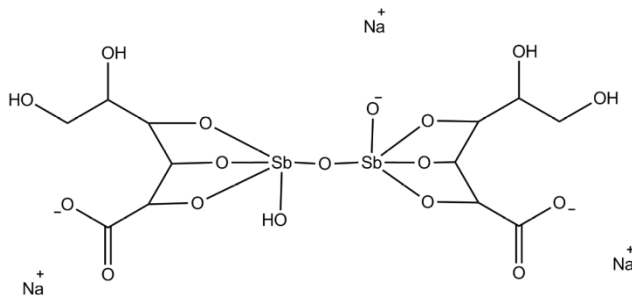
Hieronder worden de meest gebruikte geneesmiddelen, hun werkingsmechanisme en het resistentiemechanisme toegelicht.

Het is belangrijk te vermelden dat studies waarnaar verwezen wordt soms stammen gebruikten die *in vitro* resistent werden gemaakt, terwijl het best mogelijk is dat de natuurlijke (*in vivo*)

resistentiemechanismen anders zijn. Anderzijds geeft het wel een goed idee over wat potentiële resistentiemechanismen zouden kunnen zijn. Overigens is het uit de onderstaande samenvatting duidelijk dat niet alle natuurlijke resistente stammen hetzelfde resistentiemechanisme vertonen.

### 2.3.1 Antimonialen

Kaliumantimoniaaltartraat, een trivalent antimoniaal ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ), was het eerste geneesmiddel dat gebruikt werd in de bestrijding van *Leishmania* (Peters, 1981). Het was toen de enige oplossing, maar tegelijk zeer toxisch. Van zodra er alternatieven beschikbaar waren, werd hier dus naar gegrepen. Later stapte men zo over op het iets minder toxische natriumantimoniaaltartraat, en nog later (1912) het pentavalente antimoniaal ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ) ureum stibamine, hoewel zelfs deze stof nooit door de hedendaagse wetgevingen zou geaccepteerd worden omwille van zijn bijwerkingen (Mondal et al., 2010; Peters, 1981). Momenteel worden de pentavalente opvolgers, natrium stibogluconaat (SSG;



Pentostam; **fig 3**) en meglumine antimoniaat (Glucantime) gebruikt als eerstelijnsbehandeling in het grootste deel van de wereld met uitzondering van de landen waar resistentie is (vooral in Bihar (India) en Nepal) (Mondal et al., 2010).

**Figuur 3:** Natrium stibogluconaat (in oplossing).

#### 2.3.1.1 Applicatie

Antimonialen moeten dagelijks in een 20mg/kg concentratie intraveneus of intramusculair worden toegediend gedurende ongeveer 4 weken (Murray et al., 2005). De intramusculaire injecties zijn zeer pijnlijk omdat het geneesmiddel erg irriterend is, maar de intraveneuze weg is veel minder toepasbaar op grote schaal omdat ze een relatief grote medische expertise en verzorging vereist (Mondal et al., 2010). Aangezien er generische vormen op de markt zijn, valt de prijs van het geneesmiddel erg mee. Doordat er 4 weken hospitalisatie nodig is, wordt de prijs van de behandeling echter sterk opgedreven (logies, maar vooral inkomstenverlies) (Meheus et al., 2010; Mondal et al., 2010). Bovendien is de 20mg/kg een hoge dosis, wat gecombineerd met de langdurige behandeling, gepaard gaat met bijwerken door toxiciteit zoals dodelijke hartritme stoornissen, artralgie, misselijkheid en abdominale pijn (Guerin et al., 2002). De hoge dosis is echter nodig om behandelingsfalen te voorkomen (Mondal et al., 2010).

#### 2.3.1.2 Actiemechanisme

Antimonialen zijn niet enkel toxisch voor *Leishmania*, maar ze hebben ook een indirecte werking, namelijk het activeren van de macrofaag. Directe toxiciteit wordt veroorzaakt door  $\text{Sb}^{\text{III}}$ . De

omzetting van de  $Sb^V$  naar  $Sb^{III}$  is dus essentieel. Deze omzetting kan zowel enzymatisch (*Leishmania's* thiol afhankelijk reductase 1' (TDR1) en arsenaat reductase (ACR2)) als niet-enzymatisch gebeuren (trypanothion, cysteïne, glutathion), maar het relatief belang is onzeker (Denton et al., 2004; Ferreira et al., 2003; Yan et al., 2003; Zhou et al., 2004). Extracellulair  $Sb^{III}$  kan door de parasiet opgenomen worden via aquaglyceroporines (AQP1) in de membraan, maar het opnamemechanisme van  $Sb^V$  is nog onbekend (Gourbal et al., 2004).

$Sb^{III}$  heeft twee belangrijke toxische effecten op het redoxmetabolisme van *Leishmania*. Ten eerste veroorzaakt het een snelle efflux van GSH en  $T[SH]_2$ , vermoedelijk via metaal-thiol transporters (MRPA en een  $As(GS)_3$  transporter) (Dey et al., 1996; Gourbal et al., 2004; Wyllie et al., 2004; Yan et al., 2003). Verder zorgt het *in vitro* ook voor de inhibitie van trypanothion reductase (TR) door aan zijn disulfide bindingssite te binden (Cunningham & Fairlamb, 1995). Er wordt dus een snelle efflux van GSH en  $TS[SH]_2$  geobserveerd in combinatie met een verminderd vermogen om deze gereduceerde vormen te regenereren. Omdat net deze antioxidanten van groot belang zijn om de parasiet te beschermen tegen vrije radicalen en bovendien gereduceerd tryparedoxin en tryparedoxin peroxidase afhankelijk zijn van  $TS[SH]_2$ , zullen de parasieten dus veel gevoeliger worden voor de door de macrofaag geïnduceerde oxidatieve stress (Wyllie et al., 2004).

Uit studies met patiënten die een T-cel respons hebben zoals bij AIDS, waarbij de infectie vaak niet geklaard kan worden door toediening van antimonials, werd duidelijk dat een deel van het werkingsmechanisme bestaat uit het stimuleren van de immuunrespons van de gastheer (Murray, 1999; Murray et al., 1989). Eén mechanisme is reeds opgehelderd. SSG kan binden aan SHP-1 waardoor het geïnactiverd wordt, met als gevolg dat de door *Leishmania*-geïnduceerde inhibitie van verschillende gastheer-pathways ongedaan wordt gemaakt. (zie 2.1.3) (Pathak & Yi, 2001).

### 2.3.1.3 Resistentiemechanisme

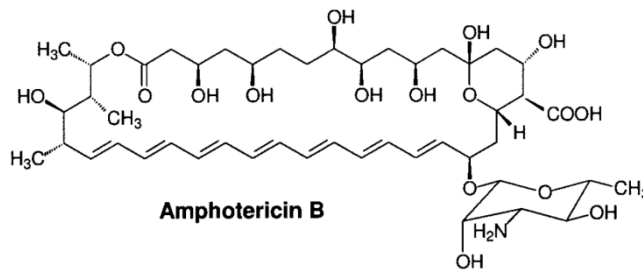
Wereldwijd kunnen antimonials 95% van de patiënten genezen, maar plaatselijk kunnen zeer hoge percentages aan behandelingsfalen gevonden worden, zoals in Bihar en het aangrenzende Nepal (Croft et al., 2006). Zo genazen slechts 35% van de patiënten door het toedienen van SSG in een studie uit Bihar van 1994-1997 (Sundar et al., 2000). In een andere studie werd aangetoond dat het in Bihar effectief om resistentie gaat (Sundar, 2001). De resistentie kan dus plaatselijk erg hoog zijn, hoewel op andere plaatsen SSG een adequate behandeling kan zijn.

Verscheidene resistentiemechanismen werden reeds ontdekt in natuurlijk resistente stammen: (i) Een verminderde omzetting van  $Sb^V$  naar  $Sb^{III}$ , waarschijnlijk door een vermindering van GSH concentraties, wat een essentiële cofactor is voor TDR1 en ACR1 (Decuyper et al., 2005). (ii) Een verminderde influx van  $Sb^{III}$ , door een lagere expressie van AQP1 (Gourbal et al., 2004; S. Mandal et

al., 2010; Mukhopadhyay et al., 2011) (iii) Een verhoogde antioxidantconcentratie en daaraan gekoppeld een verhoogde efflux van  $Sb^{III}$  (Mandal et al., 2007; Mittal et al., 2007). (iv) Een verminderde activatie van de gastheercel door o.a. stimulatie van de productie van IL-10 (Légaré et al., 2001).

### 2.3.2 Amfotericine B

Amfotericine B (AMB; **fig. 4**) is een polyeen antibiotica dat sinds 1960 wordt gebruikt als behandeling wanneer antimonialen falen in de ontwikkelingslanden (Croft et al., 2006). In Europa en Amerika



wordt het echter als basisbehandeling tegen *Leishmania* gebruikt omwille van zijn goede werkzaamheid en korte hospitalisatie (lipidenformule, zie verder) (Mondal et al., 2010).

**Figuur 4:** Structuur van Amfotericine B deoxycholaat (Croft et al., 2006).

#### 2.3.2.1 Applicatie

Oorspronkelijk werd amfotericine B deoxycholaat gebruikt. Deze vorm werd intraveneus toegediend in een dosis van 1 mg/kg om de andere dag gedurende 30 dagen (totaal dus 15mg/kg). Hoewel deze vorm zeer effectief was tegen parasieten die resistent zijn tegen antimonialen, heeft hij als nadeel dat er ook 3-4 weken hospitalisatie nodig is met daarboven bijwerkingen door toxiciteit zoals nefrotoxiciteit (met daaraan gekoppeld azotemie), hypokalemie, anemie en door het infuus zelf koorts en rillingen (Mondal et al., 2010; Murray et al., 2005).

Door later het deoxycholaat te vervangen met lipiden werd een nieuwe reeks aan geneesmiddelen gestart die specifiek door de macrofagen in de milt, de lever en het beenmerg van de patiënt opgenomen worden (Mondal et al., 2010; Murray et al., 2005). Hierdoor werden niet enkel de toxische effecten sterk verminderd, maar werd het ook mogelijk om de dosis te verhogen, waardoor de hospitalisatietijd kon teruggedrongen worden. In Bihar werd zelfs aangetoond dat een enkelvoudige dosis liposomaal AMB (Ambisome<sup>TM</sup>, 10mg/kg) even efficiënt was als een conventionele AMB-deoxycholaat behandeling (>95%) (Sundar et al., 2000). Bovendien kwamen anemie, hypokalemie, infuus-gerateerde rillingen en koorts significant minder voor ( $p < 0.05$ ) (Sundar et al., 2010).

#### 2.3.2.2 Actiemechanisme

Over het werkingsmechanisme van AMB is zeer weinig geweten. Men denkt dat het selectief *Leishmania* kan vernietigen omdat het interageert met ergosterol (Paila et al., 2010). Dit

membraanlipide komt namelijk voor bij *Leishmania* en fungi - het is oorspronkelijk een anti-fungaal geneesmiddel-, maar niet bij zoogdieren. De interactie leidt tot de vorming van transmembranaire AMB-kanalen waardoor er een verandering optreedt in membraanpermeabiliteit voor kationen, glucose en water, maar ook een invloed uitgeoefend wordt op membraangebonden enzymen (Hartsel & Bolard, 1996). Deze AMB-kanalen bestaan uit AMB-monomeren die zich organiseren als een vatstructuur met polaire hydroxylgroepen in het lumen van de porus (Hartsel & Bolard, 1996). Toch is de selectiviteit niet perfect, aangezien AMB ernstige bijwerkingen kan hebben.

Recent werd mogelijk een tweede mechanisme opgehelderd. Paila et al. (2010) toonden aan dat AMB in staat is de cholesterolmoleculen in de membraan van de macrofaag af te schermen, waardoor *Leishmania* bij stijgende AMB concentratie steeds moeilijker en moeilijker de cel kan binnendringen. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat cholesterol belangrijk is om membraandomeinen van andere (glyco-/lipo-)proteïnen, waar *Leishmania* mee zou interageren, te stabiliseren (Paila et al., 2010).

Het is aangetoond dat AMB in cellen kan auto-oxideren om zo vrije radicalen te vormen (Lamy-Freund et al., 1989). Inderdaad werden hoge ROS concentraties teruggevonden na behandeling met AMB (Purkait et al., 2012).

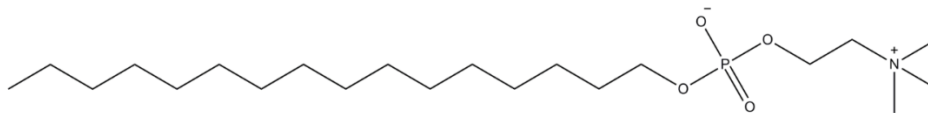
### 2.3.2.3 Resistentiemechanisme

Hoewel AMB al bijna 40 jaar gebruikt wordt, is er tot op heden nog maar weinig therapiefalen of resistentie van de parasiet gemeld (Croft et al., 2006). Anderzijds is het mogelijk dat resistentie nu in de hand gewerkt wordt met de korte, hoge doseringen van de lipidenformules. Vandaar dat het beter zou zijn om deze behandeling te combineren met een ander geneesmiddel (zie 2.3.6) (Van Griensven & Boelaert, 2011).

De meest recente en uitgebreide studie over AMB-resistentie komt van Purkait et al. (2012). Ze werd uitgevoerd op een stam met natuurlijke resistentie tegen AMB. Ten eerste werd de transcriptie van S-adenosyl-L-methionine:C-24- $\Delta$ -sterol methyltransferase (SCMT), een essentieel enzym voor de productie van ergosterol, onderzocht. SCMT heeft 2 transcripten, SCMT A en SCMT B. SCMT A werd enkel in AMB-sensitieve (AMB-S) stammen geproduceerd, terwijl SCMT B vooral bij de *in vitro* AMB-resistente stammen (AMB-R). Bovendien werd aangetoond dat de membraan van de AMB-S stammen voor 28% uit ergosterol bestond en voor 34% uit zijn isomeer ergosta-5,7,24(28)-trien-3- $\beta$ -ol tegenover een afwezigheid van ergosterol en 62% ergosta-5,7,24(28)-trien-3- $\beta$ -ol in de AMB-R stammen. Vermoedelijk vindt er dus geen translatie plaats van SCMT B of is dit proteïne niet in staat te zorgen voor ergosterol productie, waardoor dit membraanlipide afwezig is in AMB-R en er geen transmembranair AMB-kanaal gevormd kan worden.

### 2.3.3 Miltefosine

Miltefosine (hexadecylfosfocholine; **fig. 5** ; MIL), een geneesmiddel dat oorspronkelijk ontwikkeld werd als middel tegen kanker, is het enige oraal in te nemen middel dat momenteel op de markt is tegen *Leishmania*. Dit verhoogt aanzienlijk het gebruiksgemak, maar zorgt anderzijds voor een groot potentieel om resistentie te ontwikkelen aangezien mensen vaak vroegtijdig de behandeling stoppen, iets wat maar al te duidelijk wordt wanneer gekeken wordt naar de evolutie van resistentie bij courante antibiotica.



**Figuur 5:** Structuur van miltefosine.

#### 2.3.3.1 Applicatie

Afhankelijk van het lichaamsgewicht wordt 50–100 mg gedurende 28 dagen voorgeschreven. Het geneesmiddel heeft vooral gastro-intestinale bijwerkingen zoals braken (~60%), diarree (~20%) en misselijkheid, maar deze reacties zijn meestal tijdelijk en verdwijnen tijdens de behandeling (Mondal et al., 2010). Een groter probleem vormt echter de teratogeniciteit van MIL aangezien vruchtbare vrouwen ongeveer 1/4 van de patiënten vormen en het geneesmiddel nog tot 6 maanden detecteerbaar blijft in het bloed (officiële contra-indicatie voor vruchtbare vrouwen tot 3 maanden na behandeling) (Dorlo et al., 2008). Deze lage, maar langdurige concentraties aan MIL zijn bovendien ideaal voor de ontwikkeling van resistente parasieten bij herinfectie of wanneer de behandeling niet werd voltooid.

#### 2.3.3.2 Actiemechanisme

Over het actiemechanisme van MIL is nauwelijks iets geweten. De enige zekerheid is dat miltefosine op een nog onbekende manier in staat is om apoptosis-achtige celdood te induceren bij *Leishmania*, met zijn typische fenomenen zoals nucleaire DNA condensatie, fragmentatie en laddervorming op gel (Marinho et al., 2011; Paris et al., 2004). Tevens zijn er enkele aanwijzingen voor pathways die miltefosine mogelijk beïnvloedt. Zo zorgt MIL voor een blokkering van de fosfatidylcholine biosynthese door inhibitie van CTP:phosphocholine-cytidylyltransferase. Dit werd echter enkel getest op een levercellijn van de hond, dus het is niet zeker of dit ook een mechanisme is bij *Leishmania* (Haase et al., 1991). Wel werd er in *Leishmania* aangetoond dat het lipidenmetabolisme mogelijk verstoord wordt door inhibitie van glycosomaal alkyl-specifiek acyl-Co-A acyltransferase (Lux et al., 2000). In kankercellen werd waargenomen dat MIL ook interageert met cellulaire carriers, met inhibitie van de incorporatie van choline, methionine en desoxyglucose tot gevolg. Bovendien is het mogelijk dat deze inhibitie leidt tot de depletie van essentiële nutriënten, wat kan leiden tot celdood

(Croft et al., 2003). In dezelfde kankercellen werd een inhibitie van het Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-ase waargenomen (Croft et al., 2003).

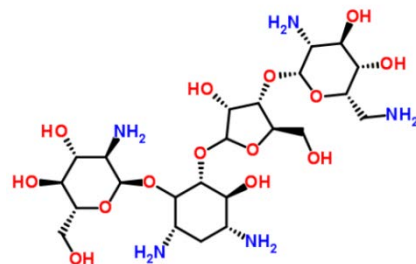
### 2.3.3.3 Resistentiemechanisme

Tot nog toe werd er geen natuurlijke resistentie tegen MIL aangetoond, al faalt de behandeling soms wel (Mondal et al., 2010). Recent werd in India gerapporteerd dat momenteel ongeveer 90.3% van de patiënten na 6 maanden nog genezen is, terwijl dat in 1999–2000 nog 94% was (Rijal et al., 2013; Sundar et al., 2012). Er werd dus graduele achteruitgang van behandelingsefficiëntie geobserveerd. *In vitro* werd er echter al wel resistentie geïnduceerd en hierbij werd een 95% vermindering van intracellulaire MIL-accumulatie gevonden, wat later kon gekoppeld worden aan puntmutaties in de allelen van een nieuw ontdekt P-type ATPase, LdMT, waardoor deze geen MIL meer kon opnemen uit de omgeving (Pérez-Victoria et al., 2003). Dezelfde onderzoekers vonden ook dat de ‘P-glycoproteïen-lijke transporter’ (ABC superfamilie) in resistente parasieten voor een verhoogde efflux van MIL zorgt (Pérez-Victoria et al., 2001). In een andere studie werd vastgesteld dat resistente parasieten ook een verhoogd percentage verzadigde vetzuren in hun plasmamembraan vertoonden. Ook dit is waarschijnlijk een resistentiemechanisme aangezien in dezelfde studie werd aangetoond dat MIL moeilijker interageert met plasmamembranen die een hogere concentratie aan verzadigde vetzuren hebben (Rakotomanga et al., 2005).

### 2.3.4 Paromomycine

Paromomycine (**fig. 6**; PMM) is een aminoglycoside, een breed spectrum antibioticum. Hoewel studies al in 1980 begonnen, is het pas recentelijk beschikbaar in India (2006), maar vertoont daar uitstekende resultaten.

**Figuur 6** (links): Structuur van Paromomycine (Chemspider, ID: 22598).



#### 2.3.4.1 Applicatie

Normaalgezien wordt PMM gedurende 21 dagen in een dosis van 15mg/kg intramusculair geïnjecteerd, maar er zijn ook al studies uitgevoerd met een 14 dagen behandeling met een 11mg/kg dosis, waarbij de genezing wel iets lager lag (84% t.o.v. 94.6) (Sundar et al., 2007, 2009). De bijwerkingen zijn zeer gering in vergelijking met de andere geneesmiddelen: 2% ototoxiciteit, 1.8% stijging in levertransaminases en 50% milde pijn op de plaats van de injectie (Mondal et al., 2010).

Door zijn krachtige werking, lage toxiciteit en lage kostprijs is PMM momenteel een uitstekende keuze voor combinatietherapie (PMM-MIL, PMM-AMB en in regio's met weinig Sb<sup>v</sup> resistentie PMM-Sb<sup>v</sup>).

#### 2.3.4.2 Actiemechanisme

Het is geweten dat PMM in bacteriën interageert met de ribosomen en zo de translatie blokkeert, maar niet of dit in *Leishmania* ook het geval is, al zijn er wel aanwijzingen in die richting (Davis, 1987). Zo bindt PMM op zowel de cytoplasmatische als de mitochondriale ribosomen van *Leishmania* en wordt er een verminderde translatie gezien na incubatie met PMM (Davis, 1987; Forget et al., 2006).

Met de huidige wetenschappelijke kennis kan volgend opnamemechanisme van PMM worden samengesteld. PMM bindt op de paraflagellaire 'rod' proteïnes en prohibitine (Chawla et al., 2011). Deze eiwitten komen allebei voor aan de flagellaire pool. De flagellaire pocket heeft een endocytotische functie bij *Leishmania*, dus het is waarschijnlijk door het binden aan de 'rod' proteïnes en aan prohibitine dat PMM geëndocyteerd wordt (Chawla et al., 2011). Dit wordt ondersteund door het feit dat verscheidene inhibitors van endocytose zorgen voor een 35% vermindering in opname van PMM (Jhingran et al., 2009). In de cel inhibeert PMM dan vervolgens proteïnesynthese, waarschijnlijk o.a. door binding aan de ribosomale subunits. Ook wordt er een toename in membraanrigiditeit waargenomen als gevolg van een veranderde lipidensamenstelling (Maarouf et al., 1997).

#### 2.3.4.3 Resistentiemechanisme

Tot nu toe werd er nog geen natuurlijke resistentie tegen PMM aangetroffen bij *Leishmania*, maar er werd wel reeds onderzoek gedaan naar *in vitro* geïnduceerde PMM resistentie. Ook werd er gerapporteerd dat bij 2 patiënten met diffuse cutane leishmaniasis, die hervielen na 60 dagen behandeling met PMM, *Leishmania* isolaten een 3x tot 5 x hogere tolerantie hadden voor PMM dan stammen geïsoleerd voor de behandeling (Teklemariam et al., 1994).

Over mogelijke resistentiemechanismen is weinig geweten. Er werd een verhoogde translatie van ribosomale proteïnen geobserveerd, wat interessant is aangezien PMM op de ribosomen bindt (Chawla et al., 2011). Ook werd aangetoond dat PMM veel trager wordt opgenomen in stammen met *in vitro* resistentie tegen dit geneesmiddel (Maarouf et al., 1998).

#### 2.3.5 Combinatietherapie

Combinatietherapie biedt een aantal interessante perspectieven voor het genezen van Leishmaniasis in de toekomst. Door minstens 2 geneesmiddelen tegelijk te gebruiken wordt de therapie potentieel veel dodelijker voor *Leishmania*, waardoor niet enkel een minder lang ziekenhuisverblijf en zo een verlaagde behandelingskost kunnen gerealiseerd worden, maar bovendien de kans op resistentie aanzienlijk verminderd wordt (Mondal et al., 2010).



In het ideale geval wordt geopteerd voor de combinatie van de 2 volgende principes. Ten eerste moeten de 2 geneesmiddelen een verschillend doelwit hebben, zodat de parasiet op meerdere gebieden tegelijk aangevallen wordt. Hierdoor wordt de behandeling veel efficiënter (Mondal et al., 2010). Daarboven moet gekozen worden voor de combinatie van een geneesmiddel met een korte halfwaardetijd, die de parasietpopulatie een ware klap toebrengt, en een lange halfwaardetijd om de overblijvende parasieten op langere termijn te elimineren (Mondal et al., 2010).

In een recente studie van Sundar et al. (2011) werd de conventionele AMB-deoxycholaat behandeling vergeleken met verschillende combinatietherapieën; 1 dosis van 5mg/kg liposomaal AMB en 7 dagen telkens 50 mg MIL of 10 dagen 11mg/kg PMM; of 10 dagen PMM en MIL aan dezelfde concentraties. Er werd geen verschil gevonden in effectiviteit tussen de conventionele behandeling en de combinatiebehandelingen met hun aanzienlijk kortere behandelingsduur. Bovendien werden er bij de combinatietherapieën veel minder bijwerkingen gemeld. De combinatie van liposomaal AMB en MIL is zeer interessant omdat er slechts 1 behandeling door een arts nodig is, waarna de persoon huiswaarts kan keren. Anderzijds is MIL ongeschikt voor vruchtbare vrouwen door zijn teratogene karakter. Een studie van Meheus et al. (2010) toont aan dat de PMM-MIL combinatie de kleinste kost per vermeden overlijden heeft (met 91 USD/vermeden overlijden), de andere twee behandelingen volgen pas rond de 140USD, net in het voordeel van AMB + MIL (Meheus et al., 2010).

In het verleden werden ook verscheidene studies uitgevoerd op de combinatie van PMM met SSG. Hieruit bleek dat deze combinatie beter werkt dan SSG alleen (Chunge et al., 1990; Thakur et al., 2000). In Afrika blijkt deze combinatie zelfs zeer succesvol te zijn. Zo bleek 17 dagen combinatietherapie de sterftekans met meer dan 40% te verminderen en het aanslagen van de behandeling van 92.4% naar 97% te doen stijgen ten opzichte van 30 dagen SSG-monotherapie. Bovendien heeft het verkorten van de behandelingsduur een aanzienlijk financieel voordeel voor de patiënten (minder ziekenhuiskosten, meer loon) (Melaku et al., 2007). In regio's zoals Bihar, met aanzienlijke SSG-resistentie, is het waarschijnlijk niet meer interessant deze combinatie te gebruiken omdat dit dezelfde gevolgen zou kunnen hebben als monotherapie alleen.

### 3 Materiaal en methoden

#### 3.1 Gebruikte stammen, hun resistentieprofiel en cultivatie

De stam MHOM/ET/67/HU3 van *L. donovani* werd resistent gemaakt tegen AMB, MIL, PMM, SB (trivalent) en de combinaties AMB-MIL, AMB-PMM, AMB-SB, MIL-PMM, SB-PMM door het 'Laboratory 204 of the Instituto de Parasitología y Biomedicina Lopez-Neyra, CSIC' (**tabel 1**). Dit gebeurde door ze gedurende 30 passages in 10 weken bloot te stellen aan stijgende concentraties van het specifieke geneesmiddel. Alle stammen hebben dus dezelfde genetische achtergrond (isogene lijnen), maar een verschillend fenotype. Dit vereenvoudigt de uiteindelijke vergelijking van alle stammen, omdat de verschillen dus enkel te wijten kunnen zijn aan het verschil in passages en de stress veroorzaakt door het geneesmiddel, en niet door een verschil in genetische achtergrond. De moederstam ('Wild Type Origineel', WTO) werd ook 30 passages in cultuur gehouden zonder geneesmiddel en op het einde hernoemd tot 'Wild Type' (WT). De vergelijking tussen de twee is belangrijk om te kunnen uitsluiten dat er teveel variatie optrad die alleen te wijten is aan passages.

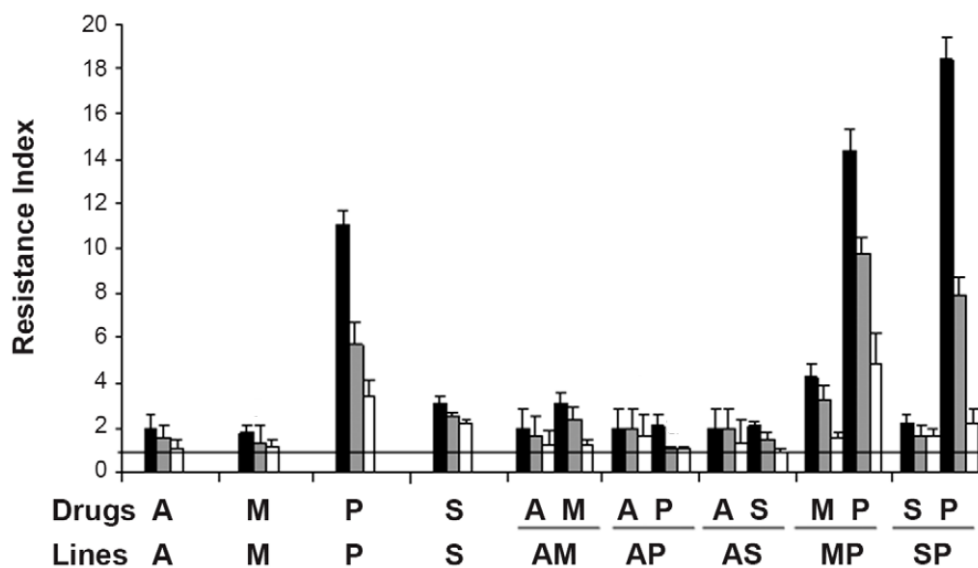
**Tabel 1:** Gebruikte stammen voor de metabolomics-analyse en hun mate van resistentie

Stam	Geneesmiddel (hoogste concentratie)	Stam	Geneesmiddel (hoogste concentratie)
WTO	/	AMB-MIL-R	0.1 $\mu$ M AMB + 8.0 $\mu$ M MIL
WT	/	AMB-PMM-R	0.1 $\mu$ M AMB + 18.0 $\mu$ M PMM
AMB-R	0.1 $\mu$ M AMB	AMB-SB-R	0.1 $\mu$ M AMB + 50.0 $\mu$ M SB(III)
MIL-R	8.0 $\mu$ M MIL	MIL-PMM-R	8.0 $\mu$ M MIL + 20.0 $\mu$ M PMM
PMM-R	20.0 $\mu$ M PMM	SB-PMM-R	82.0 $\mu$ M SB(III) + 18.0 $\mu$ M PMM
SB-R	80.0 $\mu$ M SB(III)		

Het is belangrijk op te merken dat in deze studie het metaboloom van promastigoten wordt bestudeerd om het resistentiemechanisme te bestuderen, terwijl enkel de amastigote vorm wordt blootgesteld aan het geneesmiddel in de mens. Metabolietanalyse bij amastigoten is echter problematisch omdat (i) gastheer- en parasietmetabolieten meestal niet te onderscheiden zijn, (ii) geïsoleerde amastigoten zich snel omvormen naar promastigoten, en (iii) omdat het tot op heden niet mogelijk is om voldoende amastigoten te isoleren voor metabolomics-analyse (Berg et al., 2013). Er zijn echter duidelijke aanwijzingen dat de promastigoten zich pre-adapteren aan de situatie in de gastheer en dus toch heel wat relevante informatie kunnen bevatten over het resistentiemechanisme. Metacyclische promastigoten vertonen bijvoorbeeld een verhoogde expressie van genen die relevant zijn voor infectie van gastheercellen, zoals die van het thiol-metabolisme (Adaui et al., 2011). Bovendien toonde een recente metabolomics-studie op promastigoten met natuurlijke SB-resistente stammen aan dat een aantal metabolische wijzigingen

gerelateerd konden worden aan reeds bekende SB-resistentiemechanismen (thiol-pathway, membraanfluiditeit) (Berg et al., onder review).

De resistentie-indexen van de verschillende stammen werden reeds gekarakteriseerd (García-Hernández et al., 2012). Ze drukken uit hoeveel keer hoger de EC50 van de resistente stam is t.o.v. het WT voor een bepaald geneesmiddel (**figuur 7, tabel B1**). Alhoewel er een duidelijke verhoging in geneesmiddel-tolerantie was in alle resistente stammen, was deze in AMB- en MIL-resistente stammen minder uitgesproken (uitz. MIL-PMM-R).

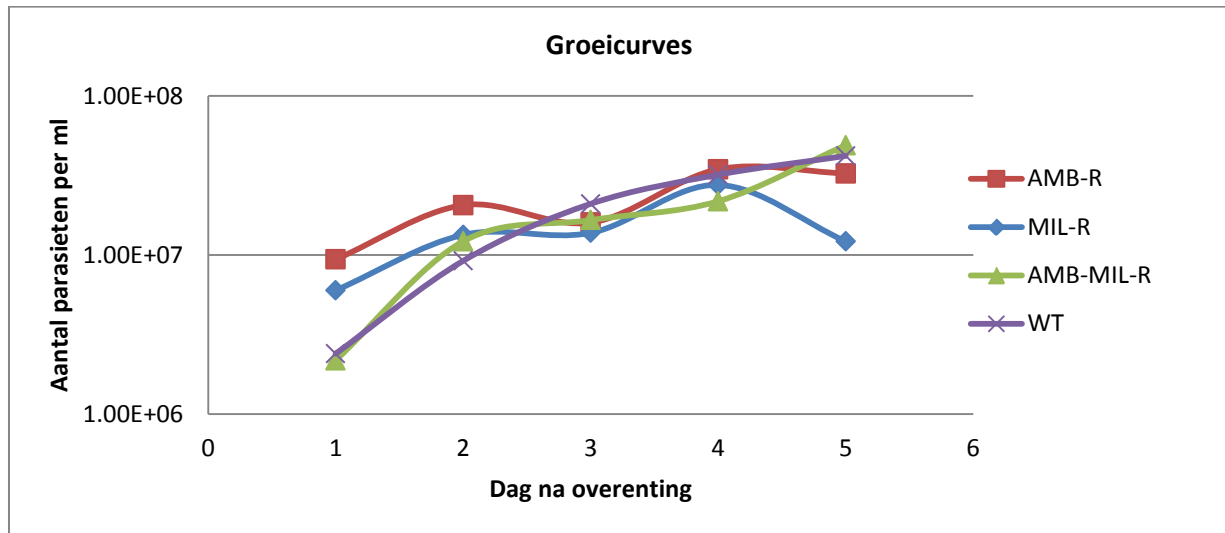


**Figuur 7:** De stammen (lines) werden in stijgende concentraties van het geneesmiddel (drugs) gegroeid gedurende 72u bij 28°C. Met een MTT assay werd bepaald hoeveel procent van de parasieten er nog in leven waren. De resistentie-index (resistance-index) werd berekend door de EC50 van de stam te delen door die van het WT. De horizontale zwarte lijn stelt een resistentie-index van 1 voor, wat equivalent is met een volledig verlies aan resistentie. A=AMB, M=MIL, P=PMM en S=SB en bij de resistente lijnen werd de '-R' weggelaten. De zwarte balken staan voor de resistentie-index wanneer de stammen onder geneesmiddeldruk gehouden werden. De grijze en witten balken tonen de stabiliteit van het resistente fenotype na respectievelijk 1 en 4 maanden groei in geneesmiddel-vrij medium (Figuur aangepast uit García-Hernández et al., 2012).

Er werden cryostabilaten gemaakt van deze stammen met 10% glycerol en deze werden gekoeld (-78°C) verzonden naar ITG. Hier werden zij bewaard in cryovaten met vloeibare stikstof (-196°C) tot op het moment van gebruik.

De cryostabilaten werden ontdooid en 1ml van het stabilaat werd toegevoegd aan 4 ml RPMI medium met 20% HiFBS (heat inactivated fetal bovine serum). Vervolgens werden de stammen meerdere keren overgeënt om ze de kans te geven om te recupereren na het invriezen. Vanaf passage 3 werden de resistente stammen terug blootgesteld aan hun bijbehorende geneesmiddel(en) om de specifieke aanpassingen aan deze stresscondities te behouden. Culturen werden om de 3-5 dagen overgeënt. Uit de groeicurves werd het duidelijk dat dag 4 de beste was om

tot extractie over te gaan (**Fig. 8**): op deze dag zijn de stammen in hun stationaire fase, waar de hoogste concentratie aan metacyclische parasieten te vinden is (Ouakad et al., 2011). Langer wachten was niet opportuun aangezien de parasietpopulatie dan reeds begon te verminderen en er celdood begon op te treden (dag 5).



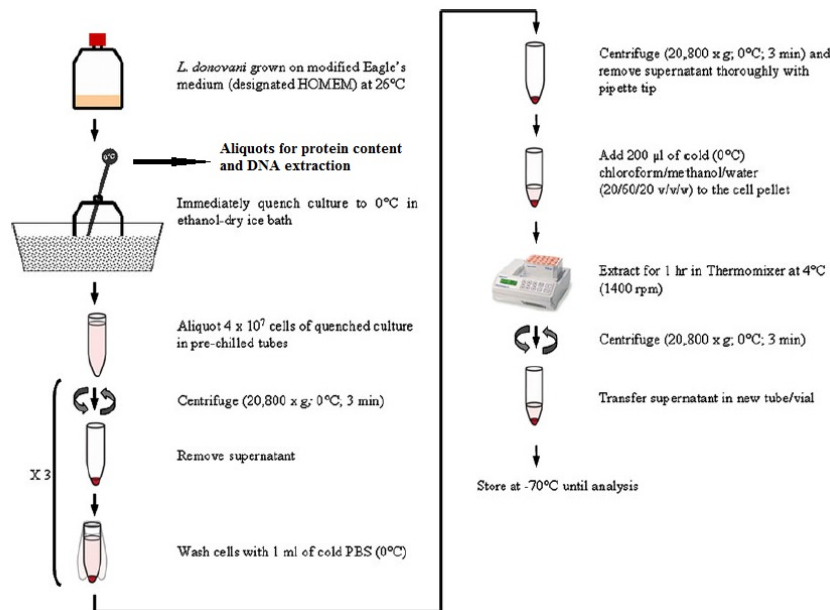
**Figuur 8:** Groeicurves van AMB-R, MIL-R, AMB-MIL-R en WT (ter illustratie).

### 3.2 Extractie metabolieten

De extractieprocedure van de metabolieten werd gebaseerd op een protocol dat geoptimaliseerd is door t'Kindt et al. (2010; **Fig. 9**) voor metabolomics analyse via HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) gekoppeld aan orbitrap massaspectrometrie. Verschillende methoden voor oa. het quenchen van de parasieten, het optimale aantal keren wassen van de parasietpellet, extractietijd en extractietoestel werden afgewogen op basis van reproduceerbaarheid en rendement. Andere stappen werden op basis van reeds bestaande literatuur gekozen.

Per isogene stam werden 4 flacons, biologische replicaten (BR) genoemd, met parasieten in cultuur gehouden. Deze replicaten staan toe om biologische variatie in de culturen en technische variatie door extractie en injectie later beter te kunnen inschatten en mee in rekening te brengen. De culturen werden eerst geteld in een telkamer om zo de concentratie aan parasieten te kunnen bepalen. Metabolietextractie gebeurde op dag 4 (zie ook sectie 2.1). De flacons werden eerst gedurende 1 minuut in een droog ijs-ethanol bad op 0°C gehouden. Vervolgens werden  $4 \cdot 10^7$  cellen geïsoleerd en gecentrifugeerd ( $18218 \times g$ ) gedurende 5 minuten bij 0°C. Het supernatans werd vervolgens bewaard bij -80°C. Dit materiaal kan eventueel later nog gebruikt worden voor een 'footprint' studie (onderzoek op metabolieten die door de parasiet worden uitgescheiden). De pellet werd 3x gewassen met 1ml PBS en telkens bij analoge condities als hierboven gecentrifugeerd. Hierna werd 200µl (0°C) extractiemengsel toegevoegd aan de pellet (1/3/1 (v:v:v))

chloroform/methanol/water). Dit mengsel bevatte ook een interne standaard ( $^{13}\text{C}$ -glycine) om later de extractie-efficiëntie te kunnen nagaan. De eigenlijke extractie vond plaats in een thermomixer (1u, 1400rpm, 4°C), gevolgd door een centrifugatiestap (18218 x g). Vervolgens werd 2x 100µl supernatans per staal naar LC-MS flesjes overgebracht. Er werd ook een gepoold staal gemaakt door telkens 15 µl van BR4 van elke stam te nemen, waarvan vervolgens een dilutiereeks ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ) werd gemaakt. De flesjes werden ingevroren bij -70°C tot de analyse (metabolomics) en de pellet bij -80°C.



**Figuur 9:** Protocol voor metabolietextractie (aangepast uit t' Kindt et al. (2010)).

### 3.3 Kwantificatie van het percentage metacyclische parasieten

Metacyclische promastigoten hebben een gewijzigd metabolietpatroon vergeleken met procyclische promastigoten, omdat het ene levensstadium infectie van de gastheer beoogt en het andere celdeling (Berg et al., onder review). Ook *in vitro* vindt er metacyclogenese plaats (Ouakad et al., 2011), maar het percentage metacyclische parasieten kan verschillen tussen behandelingen. Het is dan ook noodzakelijk om het aantal metacyclische parasieten in een cultuur te bepalen zodat hier rekening mee kan worden gehouden bij de interpretatie van de resultaten. Metacyclische parasieten worden gekenmerkt door een kort cellichaam en een lange flagel (zie ook 1.1.2) en kunnen hierdoor onderscheiden worden van procyclische parasieten die een groter cellichaam en relatief kortere flagel hebben (Ouakad et al., 2011).

Om het aantal metacyclische parasieten te bepalen werd een druppel parasieten uit de flacons voor metabolietanalyse gedroogd op een microscoopglas, gefixeerd met methanol en gekleurd met 10% (v/v) Giemsa. Vervolgens werd met een lichtmicroscop en het 'Cell D' programma (Olympus) de lengte en breedte van het cellichaam en de flagellengte van minstens 100 parasieten per

behandeling gemeten. Er is echter geen absolute definitie vanaf welke parasietoppervlakte (LW) of ratio van flagellengte op parasietoppervlakte (FL) men over metacyclische parasieten kan spreken. Op basis van K-means clustering van FL en LW kan deze methode de best-mogelijke subpopulatie metacyclische parasieten identificeren en zijn aandeel berekenen in de totale populatie. 95% confidentie-intervallen op dit percentage werden bekomen door bootstrapping en  $p$ -waarden door permutaties. De methode werd gevalideerd aan de hand van reeds bestaande morfometrische data van Ouakad et al. (2011). In deze studie bekwam men hetzelfde percentage metacyclische parasieten en deze resultaten kwamen bovendien overeen met andere types experimenten om metacyclo-genese te bepalen (resistentie tegen complementlyse en infectiviteitsdata) (Ouakad et al., 2011).

### 3.4 HILIC chromatografie gekoppeld aan Orbitrap Exactive massaspectrometrie

De metabolietdetectie gebeurde door HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) gekoppeld aan Orbitrap Exactive massaspectrometrie (Thermo Scientific). Naast de extracten werden ook authentieke standaarden (4 verschillende mengsels met 217 metabolieten in totaal) gemeten. De standaarden hebben als doel later een predictieve retentie te bepalen voor de andere gedetecteerde metabolieten via een 'Quantitative structure-retention relationship-model' (QSRR) (zie 2.7). Elke standaard werd bovendien gelopen voor, in het midden van, en na de andere stalen om te controleren of de metingen correct verliepen (aangezien het hier telkens 3 technische replicaten betreft zouden deze 3x dezelfde waarden moeten geven). Ook de stalen van de stammen zelf werden in een gerandomiseerde volgorde gelopen (Berg et al., 2013). Een lijst van alle stalen die gelopen werden en hun volgorde is terug te vinden in **tabel B2**.

#### 3.4.1 HILIC chromatografie

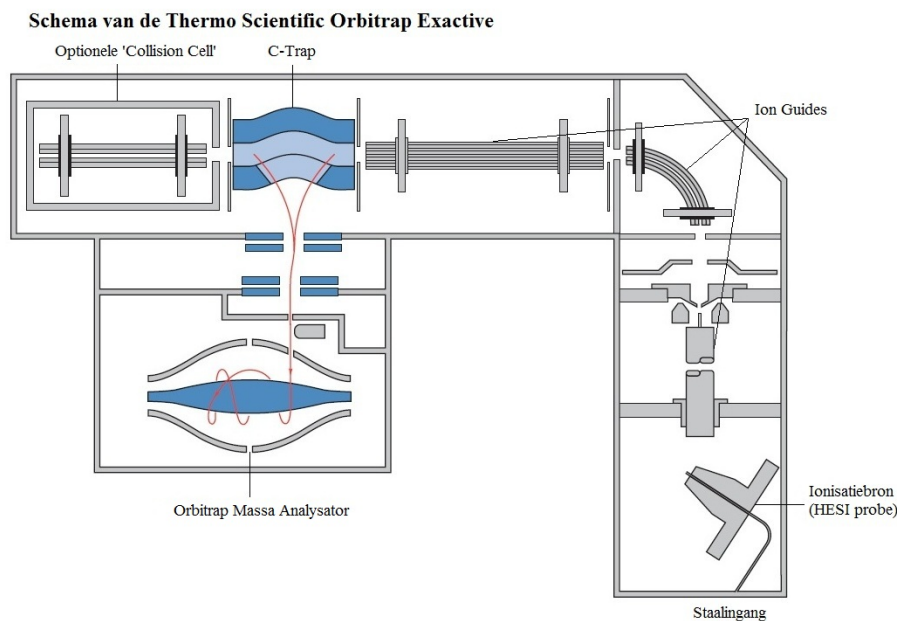
De HILIC kolom bestaat zoals 'reversed phase chromatography' uit een polaire mobiele fase en zoals 'normal-phase chromatography' ook uit een polaire stationaire fase. Er werd geopteerd voor deze kolom omdat deze uitermate geschikt is om polaire componenten te scheiden (vele metabolieten hebben een polair karakter). Bovendien heeft de techniek als voordeel dat fosfolipiden geen retentie vertonen op HILIC (T'Kindt et al., 2010). Bij 'reversed-phase chromatography' is dit wel het geval en zouden ze tegelijk met interessante metabolieten van de kolom elueren, en hierdoor mogelijks ionsuppressie veroorzaken (Annesley, 2003). Deze kolom wordt dus vaak gebruikt voor metabolomics-studies bij *Leishmania* en *Trypanosoma* omwille van zijn voordelen (T'Kindt et al., 2010).

Men spreekt over 'ZIC'-HILIC omdat zwitterionische groepen in de kolom gebonden zitten op poreus silica. Deze zwitterionen bestaan uit quaternaire ammoniumzouten en sulfonzure groepen en zorgen ervoor dat er op lading gescheiden wordt. De silicagroepen houden een laagje water vast waardoor

er 'hydrophilic partitioning' optreedt; hoe polairder de component, hoe sterker hij zich vanuit de mobiele fase naar dit laagje zal begeven en hier vastgehouden worden. Als mobiele fase werd geopteerd voor een stijgende verhouding van water/acetonitrile (waarin dus de polaire componenten steeds beter oplossen), aangezuurd met 0.1% mierenzuur.

### 3.4.2 Orbitrap Massaspectrometrie

De Orbitrap Exactive is een zeer gevoelige massaspectrometer die verschillen tot 1-2ppm kan detecteren. Hij bestaat achtereenvolgens uit een staalingang, een ionisatiebron, 'ion guides', de C-trap en de orbitrap zelf (fig. 10).



**Figuur 10:** Schema van de Orbitrap Exactive (Thermo Scientific).

Eerst worden ionen gegenereerd aan de hand van 'heated-electrospray ionization' (H-ESI). Deze techniek heeft als doel de metabolieten om te zetten in ionen en deze op te lossen in de gasfase. Er ontstaan hierbij zowel positieve als negatieve ionen. De Orbitrap Exactive heeft als groot voordeel dat hij enkele keren per seconde van polariteitsmodus kan wisselen om zowel positieve als negatieve ionen te kunnen meten. In de volgende stap worden de ionen versneld door de 'ion guides' en worden ze verzameld in de 'C-trap', een quadrupool die gebogen is in een C-vorm. Elk verzameld pakketje wordt daarna naar de orbitrap versneld. Deze bestaat uit een centrale elektrode (de spoel) met daarrond een buitenste elektrode die uit 2 helften bestaat. De ionen worden geïnjecteerd in het elektrische veld tussen deze twee elektroden en zullen daarna een spiraalvormig traject volgen. De axiale oscillaties vormen de basis voor de massadetectie aangezien ze omgekeerd evenredig zijn met de vierkantswortel van  $m/z$ . Er wordt continu gedetecteerd welke stroom er op de 2 buitenste elektroden wordt geïnduceerd door de bewegende pakketjes ionen. Het bekomen frequentiespectrum is eigenlijk de som van alle individuele frequentie-spectra (hoeveel keer een

massa langs de detector komt, en hoe sterk de stroom is die hij opwekt) van de individuele metabolieten die via Fourier-transformatie kan worden bekomen. Daarna worden ze omgezet naar een massaspectrum.

### 3.5 Metaboliet Identificatie

De massaspectrometer (MS) genereert duizenden massapieken, afkomstig van zowel MS-artefacten als metabolieten. De grootste uitdaging is dan ook om uit deze grote dataset enkel de relevante biologische informatie te extraheren. Hier werd geopteerd voor een protocol ontwikkeld door Scheltema et al. (2011). Dit protocol werd apart doorlopen voor de positieve en negatieve modus van de Orbitrap Exactive tot wanneer gegevens van beiden gecombineerd werden in IDEOM (zie verder).

De data die met de massaspectrometer genereerd werd (met extensie \*.raw) moest eerst worden geconverteerd naar het \*.mzXML formaat met het programma 'Msconvert' gestuurd vanuit 'R'. \*.mzXML is een standaardformaat waarop analyses door software kunnen worden uitgevoerd. In 'R' werd vervolgens de 'XCMS-tool' gebruikt voor 'peak picking'. Hierbij gaat de software uit het \*.mzXML-bestand de pieken (retentietijdpiek voor elke gedetecteerde massa) extraheren met gebruik van een vooraf gedefinieerde filter. Deze filter bestaat uit: ppm, de minimale en maximale piekbreedte, de S/N threshold en de prefilter. ppm is een maat voor de massa-accuraatheid en werd ingesteld op 2. Eigenlijk is de accurateheid van de orbitrap 1ppm, maar het is altijd mogelijk dat er massa's verschoven zijn door een foute kalibratie (meestal in een klein deel van het massabereik).

**Formule 1:** 
$$ppm = \frac{10^6 * |Theoretische\ massa - gedetecteerde\ massa|}{Theoretische\ massa}$$

De minimale en maximale piekbreedte geven samen weer welk bereik van breedtes wordt toegelaten. De S/N ratio of 'signal' over 'noise' ratio bepaalt hoeveel sterker de piek t.o.v. de drempelwaarde (5x ruis) moet zijn. De prefilter geeft het aantal scans (pakketjes) weer dat een grotere intensiteit moet hebben dan een bepaalde drempelwaarde. Alles dat niet voldoet aan deze voorwaarden wordt weggefilterd.

Vervolgens plaatste het 'R' pakket 'mzMatch' de overeenkomstige pieken van de verschillende biologische replicaten bij elkaar en wordt de data verder gefilterd. MzMatch begint steeds met de meest intense piek en combineert deze met andere pieken die binnen een vooraf bepaald massabereik en retentiebereik liggen. Bij ons was dit respectievelijk 5ppm en 0.5min. Hierna gaat mzMatch de RSD filter toepassen. Enkel groepen van pieken die niet teveel van elkaar afwijken qua intensiteit worden toegelaten. Wij opteerden voor een maximaal toegelaten standaarddeviatie van 50%. Daarna zorgt de geïntegreerde coda-dwfilter ervoor dat de ruis verminderd wordt door pieken



met een slechte vorm ( $\text{codaw} < 0.80$ ) uit de selectie te halen. Vervolgens worden enkel pieken die in 3 of meer stalen gedetecteerd zijn (4 biologische replicaten \* 4 isogene stammen, dus minimum 3 op 16 in totaal), bijgehouden. Ook pieken onder de intensiteits-drempelwaarde van 3000 worden uit de selectie verwijderd omdat deze signalen meestal weinig betekenis hebben (contaminaties etc.). 'GAPfiller' haalt vervolgens alle overeenkomstige pieken terug die niet door de verschillende filters geraakt waren bij de ene stam, maar wel bij een andere stam. Als dit niet zou gebeuren, zou dit tot de foute interpretatie kunnen leiden dat er geen piek gedetecteerd werd in een van de stammen, terwijl deze er wel voorkwam, maar verwijderd werd door een van de filters. Hij haalt ook de rest van een piek terug wanneer deze niet helemaal binnen het retentietijdtraam viel. Vervolgens worden gerelateerde pieken samengeplaatst in een cluster. Gerelateerde pieken zijn pieken die afkomstig zijn van isotopen, fragmenten en derivaten gevormd tijdens het ionisatieproces (Scheltema et al., 2009). MzMatch tracht deze te identificeren aan de hand van een iteratief proces (Scheltema et al., 2009). Eerst worden de meest intense, nog niet geclusterde pieksets gekozen, waarna alle andere pieksets binnen een bepaald retentietijdtraam rond deze piek verzameld worden (in deze studie 0.1 min). MzMatch correleert vervolgens al deze pieksets op basis van piekvorm met de meest intense piekset. Enkel pieken van dezelfde meting worden gecorreleerd aangezien anders verstoorde pieken de score onnodig kunnen verlagen. Deze correlatie moet boven een vooraf ingestelde drempelwaarde liggen opdat een piekset geselecteerd wordt voor verdere analyse. De volgende stap bestaat uit een correlatie van de piekintensiteitstrend. Er wordt namelijk verwacht dat de gerelateerde pieken altijd in een constante ratio aanwezig zijn over de verschillende stalen. Wanneer ook deze waarden voor bepaalde pieksets zich boven een bepaalde drempelwaarde bevinden, wordt de hele cluster (hoogste piek + gerelateerde pieksets) uit de dataset gehaald, genoteerd dat dit gerelateerde pieksets zijn, waarna de lus terug start bij de selectie van de piekset met de hoogste intensiteit. In verdere analyses is het belangrijk om er rekening mee te houden dat de meest intense piekset niet de 'basispiekset' hoeft te zijn. Met basispiekset wordt de piekset van de metabooliet bedoeld waarin men eigenlijk geïnteresseerd is, en geen adduct/fragment hiervan.

Uiteindelijk werden de metaboolieten geïdentificeerd aan de hand van hun massa. Hiervoor werden de massa's sequentieel vergeleken met de massa's uit 4 verschillende databases: de eigen metabolomics database, Kegg, Lipidmaps en een database van gekende contaminanten. Vervolgens werd er met het R-script van Jankevics et al. (2012) voor elke piekset in de dilutiereeks de Pearson correlatie berekend tussen de piekhoogte en de dilutiefactor (Jankevics et al., 2012). Enkel indien deze kleiner was dan -0.85 werd de piekset bijgehouden omdat enkel MS-artefacten geen lineaire verdunningsreeks volgen (Jankevics et al., 2012). Tot slot werd manueel nagegaan of de geïdentificeerde pieksets inderdaad de vorm hebben van een chromatografische piek (gladde lijn,

geen abrupte schommelingen, volledige piek). De naam van de metabooliet, zijn intensiteit in elke stam, zijn retentietijd, zijn dilutiereeks  $p$ -waarde en correlatie, zijn ppm en database van identificatie werden geëxporteerd naar een Excel sheet voor verdere analyse. Voor elke metabooliet werd ook zijn klasse en subklasse opgezocht in KEGG wanneer deze niet in de eigen databases vermeld werden.

Glycerofosfolipiden (GPL) werden als volgt afgekort: GPL(x:y/z), waarbij  $x$  het aantal koolstofatomen in de vetzuurzijketen voorstelt,  $y$  het aantal dubbele bindingen en  $z$  het aantal zijketens.

### 3.6 QSSR

De retentietijden van metaboolieten waarvoor geen authentieke standaard gelopen werd, werden voorspeld aan de hand van een QSRR-model (Quantitative Structure Retention Relationships). Het is een meervoudig lineair predictiemodel, opgesteld aan de hand van de retentietijden van de authentieke standaarden met de fysicochemische eigenschappen van de metaboolieten als verklarende variabelen. Dit model kan zo de retentietijden van metaboolieten waarvoor geen authentieke standaard werd gelopen, voorspellen. Dit QSRR-model werd ontwikkeld door Creek et al. en door hen geïntegreerd in IDEOM, een gebruiksvriendelijke Excel-sheet (Creek et al., 2012; Creek et al., 2011). De fysicochemische eigenschappen heeft IDEOM geëxtraheerd uit databanken zoals KEGG, Metacyc, HMDB en Lipidmaps. Om het model te valideren werd de  $R^2$  bepaald van de lineaire regressie tussen de voorspelde retentiefactor (retentietijd genormaliseerd voor dode kolomvolume) en de reële retentiefactor van de authentieke standaarden. Aangezien deze 0.7109 bedroeg gaat het hier om niet meer dan een ruwe schatting. Deze voorspelde retentietijden werden dan ook enkel gebruikt om de metaboolieten met dezelfde brutoformule (dubbele identificaties) te ordenen in volgorde van waarschijnlijkheid.

### 3.7 Fold Inductions

Vanuit de ruwe intensiteitswaarden per metabooliet werden de 'Fold Inductions' (FI) berekend. De FI drukt uit hoeveel keer meer de metabooliet aanwezig is in een bepaalde resistente stam, vergeleken met het WT. Ook de  $p$ -waarde van deze inductie werd berekend aan de hand van een 2-zijdige, homoscedastische  $t$ -test. Door het grote aantal metaboolieten in de dataset accumuleert echter al snel de kans op een type 1 fout. Er werd daarom gekozen voor de meervoudige-test-correctie van Benjamini-Hochberg die de 'false discovery rate' onder controle houdt. Hierbij werd  $q$  gelijk genomen aan 0.05 zodat maximum 5% van de significante metaboolieten vals positieven zijn. Enkel de metaboolieten met een  $q < 0.05$  werden 'significant' genoemd in de resultaten en discussie. Wanneer de metabooliet bovendien 2 keer meer of minder voorkwam dan in het WT werd hij beschouwd als differentieel. Vervolgens werden ook de klassen bekeken waarin zich wijzigingen voordeden. Met de

gratis webtool BioVenn werden bovendien venndiagrammen gegenereerd om te kijken in hoeverre de differentiële metabolieten tussen verschillende stammen overlappen.

### 3.8 Kwaliteitscontrole en data-exploratie

Als eerste kwaliteitscontrole werd er een heatmap met hiërarchische clustering opgesteld. Omdat de hiërarchische clustering op basis van de Euclidische afstand gebeurt, werden de metabolietintensiteiten omgezet naar een intensiteit van 0-100%. Om de gevormde clusters verder te clusteren werd gebruikt gemaakt van de methode 'average linkage'. Hierbij wordt een gemiddelde metabolietwaarde berekend voor alle leden van een cluster, dewelke dan wordt vergeleken met de gemiddelde waarde van andere stammen of clusters. Voor elke groep replicaten (technisch of biologisch) werden ook een TIC spectrum (Total Ion Counts) gegenereerd met een R-script. Dit spectrum toont de som van de intensiteiten van alle metabolieten voor elke retentietijd. Wanneer het TIC profiel van een staal systematisch afwijkt, wijst dit op een technische fout. De data werd ook genormaliseerd (Z-score) en vervolgens onderworpen aan een principale componentanalyse (PCA) met een script in R.

Het is mogelijk dat parasieten van de ene isogene stam grotere afmetingen hebben ten opzichte van andere isogene stammen (vb. veroorzaakt door de genesmiddelendruk) en dus gemiddeld meer metabolieten per cel bevatten. Dit houdt het gevaar in dat mogelijk differentiële metabolietconcentraties worden geobserveerd, die louter te wijten zijn aan het verschil in grootte van de parasieten en niet aan andere potentiële resistentiemechanismen. Hiermee werd op 2 manieren rekening gehouden. Ten eerste werd de totale metabolietintensiteit (som intensiteit alle metabolieten) van de verschillende stammen met elkaar vergeleken door middel van een one-way ANOVA. Op die manier is het eenvoudig op te sporen als een bepaalde stam systematisch hogere metabolietintensiteiten (en dus concentraties) heeft als een andere stam. Een tweede controle die werd ingebouwd was de one-way ANOVA vergelijking van de proteïne-inhoud. Net als de totale metabolietintensiteit wordt verwacht dat bij parasieten van dezelfde grootte deze niet significant zal verschillen (Berg et al., 2013).

De proteïne-inhoud werd als volgt bepaald. Van dezelfde 4 flasks als bij de extractie werden  $4 \cdot 10^7$  cellen genomen. Deze werden vervolgens gecentrifugeerd bij (18218 x g) gedurende 10 min (0°C), waarna het supernatans verwijderd werd en de pellet gewassen met 1ml PBS gevolgd door een tweede, analoge centrifugatie. Deze pellet werd bewaard bij -20°C om later de proteïne-inhoud te kunnen kwantificeren met een 'BCA Protein Assay Kit' (Pierce methode) van 'Thermo Scientific'. Er werd voor deze methode gopteerd omdat ze zeer eenvoudig uit te voeren is en bovendien weinig gevoelig voor de meeste contaminanten (Mallia et al., 1985).

### 3.9 Biomerkers voor resistentie

In een volgende fase werd er gezocht naar metabolieten waarvan de intensiteit een correlatie vertoont met de resistentie-index tegen een bepaald geneesmiddel (**tabel 2**), zogenaamde biomerkers.

Er werd een R-script geschreven dat voor elke metaboliet automatisch een regressie berekende tussen de fold induction en de resistentie-index in elke stam. De  $R^2$  werden geëxporteerd naar Excel en de 20 metabolieten met de hoogste  $R^2$  werden zorgvuldig geïnspecteerd naar mogelijke patronen of aangerijkte pathways.

Er werd ook een predictiemodel (multiple regressiemodel) voor resistentie opgesteld aan de hand van de hoogst scorende metabolieten. Omdat er geen dataset voorhanden was waarmee de predictiemodellen konden gevalideerd worden, werd er minstens een tweevoudige cross-validatie uitgevoerd met het pakket 'DAAG' in R om de betrouwbaarheid van de predictie na te gaan. Bovendien werden enkel metabolieten gebruikt waarbij minstens in 1 stam een FI van 2x (op of neer) had en significantie in minstens 2 stammen, om te vermijden dat er naar ruis gekeken werd.

### 3.10 Verdere data-analyse

Tot slot werd de dataset manueel geëxploreerd. In Excel werden de verschillende metabolieten op FI en significantie gerangschikt en vergeleken in de verschillende stammen. Interessante metabolieten werden opgezocht in KEGG om de pathway te kennen en in de literatuur om te weten of er reeds een link bekend was met *Leishmania* of Trypanosomatidae.

Bijlagen worden steeds aangeduid met het prefix 'B' voor hun nummer.

## 4 Resultaten

### 4.1 Kwaliteitscontrole

De TIC spectra zijn weergegeven in **figuur B4-B14**. Op basis van hun afwijkende TIC-spectra en het feit dat ze niet clusteren bij de andere biologische replicaten in de opgestelde HM, werden MIL-R\_BR1 (Fig. B5), SB-R\_BR2 (Fig. B7) en AMB-MIL-R\_BR3 (Fig. B8) niet weerhouden voor verdere analyse. De HM werd opnieuw opgesteld zonder deze replicaten.

De verschillende stammen vertoonden geen significant verschil in proteïne-inhoud ( $p = 0.2496$ , **fig. B15**) of totale metabolietintensiteit ( $p = 0.3181$ , **fig. B16**). Er werd dus besloten worden dat er geen bron van systematische variatie aanwezig was waarmee rekening gehouden moest worden zoals een fout bij de extractie of LC-MS injectie, of biologische bias door verschillen in bijvoorbeeld parasietgrootte.

De retentietijden van de standaarden kwamen goed overeen met die van de geïdentificeerde metabolieten. De verschillen in retentietijd waren steeds minder dan 2 minuten, met uitzondering van 5-oxoproline (3min, 14s). Deze laatste metaboliet heeft dus een iets lager confidentieniveau, net zoals de metabolieten waarvan de retentietijd voorspeld werd a.d.h.v. het QSRR-model.

### 4.2 Metabolietklassen

Na verwijdering van contaminanten zoals het extractiesolvent en MS-artefacten werden 266 metabolieten geïdentificeerd. Hun namen, FI t.o.v. het WT in de verschillende stammen, klassen en subklassen zijn terug te vinden in **tabel B3**. Het aantal metabolieten dat differentiëel (significante FI van meer dan 2 of minder dan 0.5) was per stam wordt weergegeven in **tabel 3**. Deze significante verschillen werden vooral teruggevonden in AMB-R (32), SB-R (29), AMB-SB-R (31) en SB-PMM-R (50). Bij AMB-R en SB-PMM-R gebeurden er zowel veel stijgingen van metabolietconcentraties als dalingen, terwijl het bij SB-R en AMB-SB-R bijna uitsluitend over stijgingen ging. Bij WTO - de moederstam waarvan alle resistente stammen en ook de WT (enkel verschil in passages) van zijn afgeleid - werden geen differentiële metabolieten gevonden.

**Tabel 3:** Aantal differentiële metabolieten ( $q < 0.05$  en  $FI < 0.5$  of  $> 2$ ). Multiple-testing correctie volgens Benjamini-Hochberg.

	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO
<b>Gestegen</b>	17	19	12	25	3	4	28	7	31	0
<b>Gedaald</b>	15	1	2	4	0	1	3	4	19	0
<b>Totaal</b>	32	20	14	29	3	5	31	11	50	0

Er werd ook gekeken in welke metabolietcategorieën deze differentiële metabolieten zich bevonden (**tabel 4**). Er werden 81 glycerofosfolipiden (GPL) opgepikt, waarbij vooral in AMB-R en SB-PMM-R

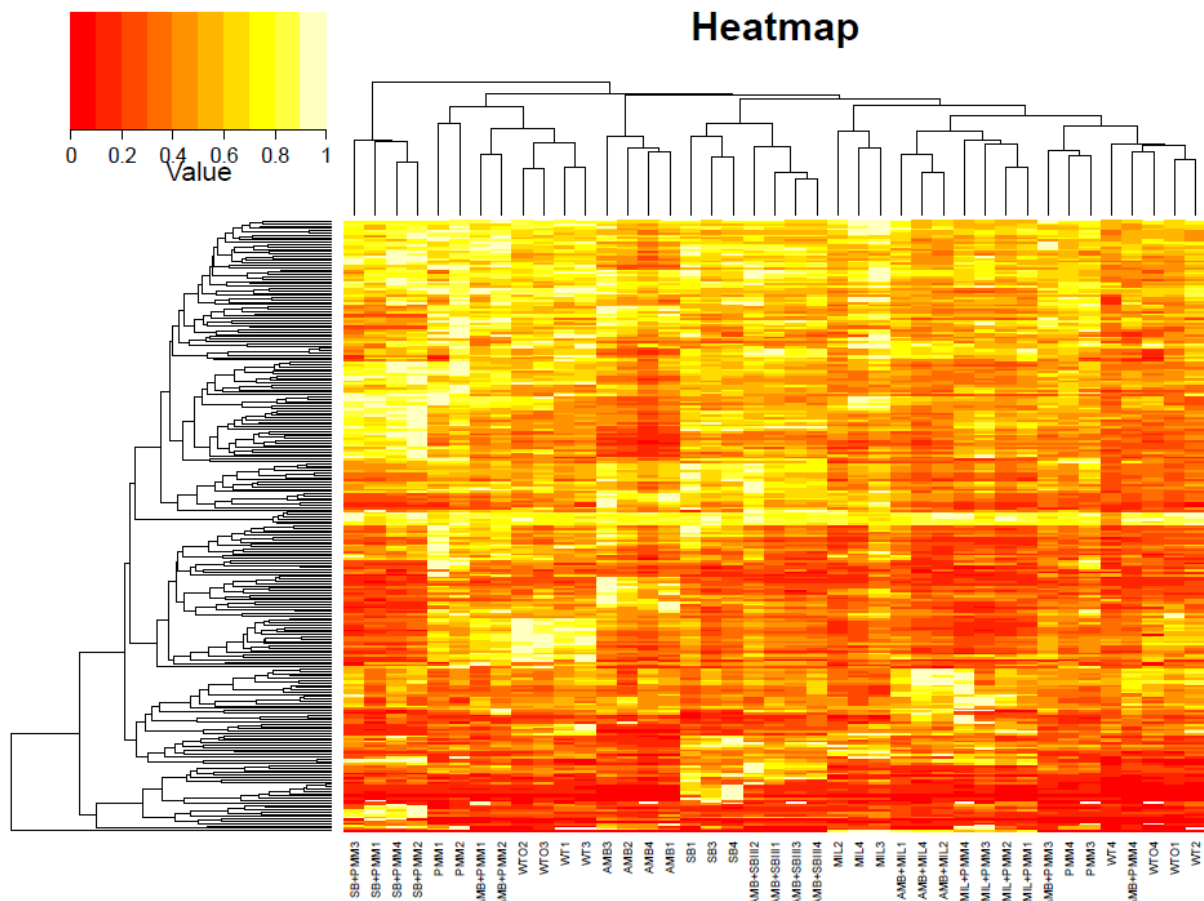
opvallende veranderingen gebeurden. In AMB-R waren 12 GPLs significant en differentieel, waarvan 6 gestegen en 6 gedaald. Resistentie tegen SB en PMM ging gepaard met een stijging van 10 GPLs en een daling van 1 GPL. Van de 33 opgepikte aminozuren en modificaties werden er enkel sporadische wijzigingen teruggevonden. Hetzelfde gold voor purines, pyrimidines en conjugaten, waarvan 12 vertegenwoordigers werden opgepikt. Vetzuren waren vooral gewijzigd in de SB-R (6 gestegen, 1 gedaald), SB-PMM-R (4 gestegen, 2 gedaald), AMB-R (4 gedaald) en AMB-SB-R (4 gestegen) (**tabel B4**). Bovendien zijn de stijgingen van X-oxo-hexaanzuur (21.7x), 7-oxo-8-amino-nonaanzuur (9.61x), succinaat-semialdehyde (7.81x) en 1,2-diacyl-sn-glycerol (7.76x) en glyceraat (4.25x) in SB-R uitzonderlijk hoog t.o.v. van de andere metaboliëten in de dataset. Carbohydraten waren opvallend gestegen in AMB-SB-R (5/7) en in SB-PMM-R (4/7) (**tabel B5**). Echter, enige voorzichtigheid bij de data-interpretatie is aangewezen aangezien er slechts 7 vertegenwoordigers van deze metaboliëtklasse gedetecteerd werden. Niet-besproken klassen kwamen minder voor in de dataset.

**Tabel 4:** Aantal metaboliëten in de metaboliëtklassen met minstens 4 vertegenwoordigers in de totale dataset ( $FI < 0.5$  of  $> 2$  en  $q < 0.05$ ). Multiple-testing correctie volgens Benjamini-Hochberg.

KLASSE	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO	TOTAAL
GPL	6	5	1	3	1	1	0	3	10	0	81
	6	0	0	0	0	0	0	2	1	0	
Aminozuren en modificaties	3	2	2	0	0	0	3	1	3	0	33
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Vetzuren	0	3	2	6	0	0	4	0	4	0	32
	4	1	1	1	0	0	0	0	2	0	
Purines, Pyrimidines en conjugaten	2	1	2	1	1	1	2	0	2	0	12
	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	
Carbohydraten en conjugaten	1	1	1	2	0	1	5	1	4	0	7
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sphingolipiden en sphingolipide-basen	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6
	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
Steroïden en derivaten	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5
	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	
Glycerolipiden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

### 4.3 Exploratie dataset

In de heatmap (**fig. 11**) wijst het samenclusteren van biologische replicaten op een duidelijk onderscheidbaar metaboliëtoprofiel van een bepaalde stam. Dit werd geobserveerd bij de stammen resistent tegen AMB, MIL, SB, AMB-MIL, AMB-SB, MIL-PMM en SB-PMM. AMB-PMM-R is geen duidelijke groep, met een cluster van twee biologische replicaten, terwijl de andere twee bij een andere groep clusteren. WT en WTO zijn onderverdeeld in twee clusters, waarbij sommige WT's meer op WTO lijken dan op andere WT. Ook de vier biologische replicaten van PMM-R clusteren in groepjes van twee, telkens samen met WT en WTO stammen.

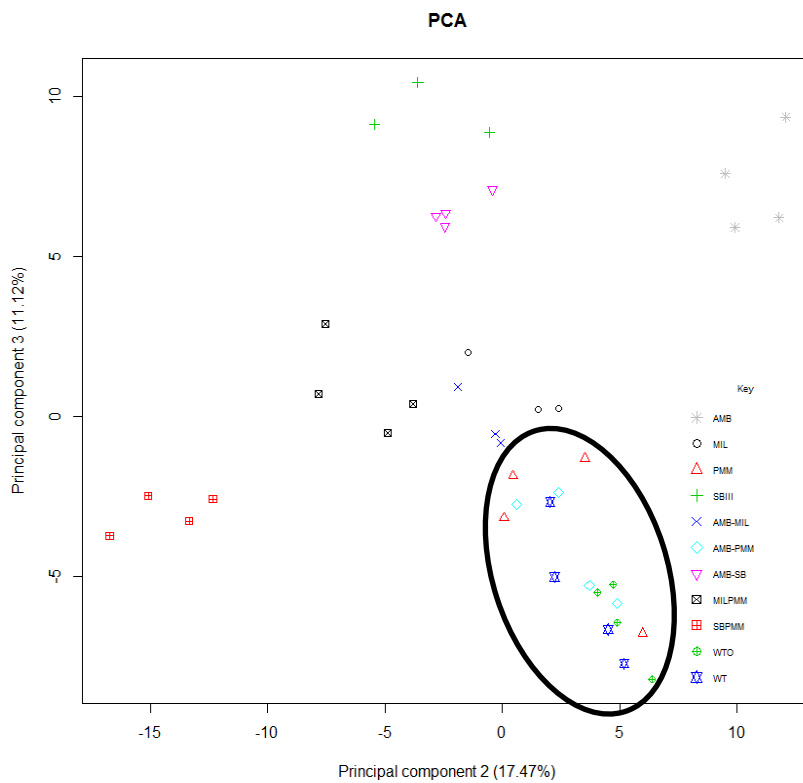


**Figuur 11:** Heatmap op basis van een hiërarchische clustering van metabolieten met een gelijkaardig profiel onder de verschillende omstandigheden (links) en van stammen met een gelijkaardig metabolietprofiel (boven). De stammen werden onderaan benoemd volgens het geneesmiddel waartegen ze resistent zijn en genummerd van 1-4 naargelang welk biologisch replicaat het betreft. Metabolietintensiteiten zijn relatief van 0 (0) tot 100% (1).

De PCA komt met deze resultaten overeen. Principale component 1 (PC) bleek vooral irrelevante variatie te bevatten (22.49%), niet in staat de resistente stammen te scheiden. **Figuur 12** toont dus PC2 en PC3, die dit wel kunnen. De BR van WT, WTO, PMM-R en AMB-PMM-R bevinden zich hier door elkaar in een centrale cluster, terwijl de andere stammen wel duidelijk van elkaar te scheiden zijn. De profielen van AMB-R, SB-R, AMB-SB-R, MIL-PMM-R en SB-PMM-R blijken erg verschillend te zijn van de centrale cluster. AMB-SB-R situeert zich veel dichterbij SB-R dan bij AMB-R. PC2 is verantwoordelijk voor de scheiding van SB-PMM-R, MIL-PMM-R en AMB-R t.o.v. de centrale cluster, terwijl PC3 voor AMB-R, SB-R, AMB-SB-R en in mindere mate AMB-MIL-R en MIL-R. De metabolieten die PC2 en PC3 uitmaken worden gewogen volgens de 'loadings'. Ze drukken uit hoeveel een bepaalde metaboliet bijdraagt tot de principale component. De 40 belangrijkste (20 positief, 20 negatief) kunnen teruggevonden worden in **tabel B6 en B7**. Aangezien het deze metabolieten zijn die zorgen voor de scheiding tussen de resistente stammen in de PCA plot, zijn ze bijzonder interessant om aanwijzingen te krijgen i.v.m. het mogelijk resistentiemechanisme of de actie van het geneesmiddel in kwestie. De positieve loadings van PC2 omvatten een hele reeks aminozuren en

derivaten zoals acetyl-homoserine, valerylglycine, N-acetyl-L-histidine, trimethyl-lysine en tyrosine, alsook di- en tri-peptiden en zowel ornithine als N-acetyl-ornithine. 16 van de 20 negatieve loadings zijn membraan (glycerofosfocholines (GPCs) en glycerofosfoethanolamines (GPEs) en ook het aminozuur proline is aanwezig. De positieve loadings van PC3 omvatten oa. indoolacrylzuur van de

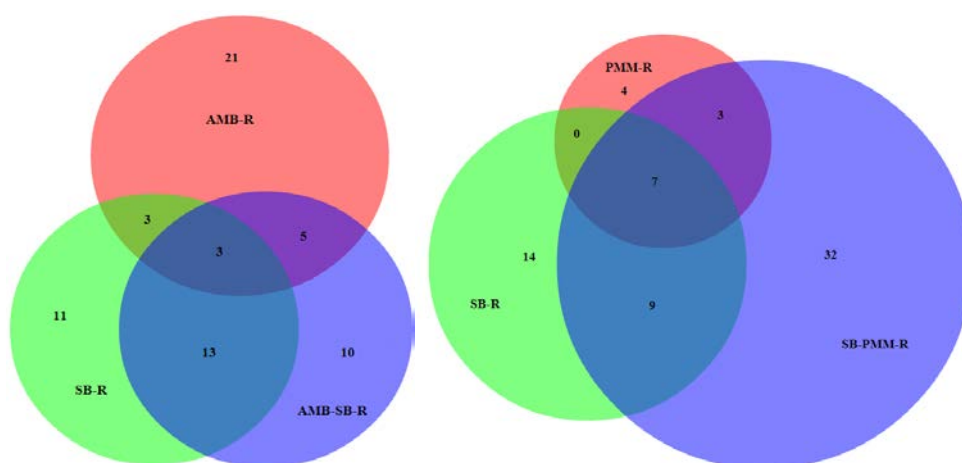
indool acrylaatpathway, maar ook de aminozuren leucine (en/of isoleucine), methionine, fenylalanine en threonine. De negatieve loadings bestaan uit 5 membraanlipiden (GPC/GPE), 7 di- of tripeptiden en o.a. citrulline en adenosine.



**Figuur 12** (links): Principale Componentanalyse (PCA) van alle stammen (PC2 en PC3 getoond). De centrale cluster met de WT, WTO, PMM-R en AMB-PMM-R werd aangeduid met een zwarte cirkel. PC2 verklaart 17.47% van de totale variatie in de dataset en PC3 11.12%.

#### 4.4 Venndiagrammen

**Figuur 13** toont de venndiagrammen van AMB-R, SB-R en AMB-SB-R enerzijds en PMM-R, SB-R en SB-PMM-R anderzijds. De andere combinaties werden niet getoond omdat de overlap erg beperkt was.



**Figuur 13:** Venndiagrammen van de differentiële metabolieten ( $q < 0.05$  en  $FI < 0.5$  of  $> 2$ ) in de stammen AMB-R, SB-R en AMB-SB-R enerzijds (links) en PMM-R, SB-R en SB-PMM-R anderzijds (rechts).



De 3 metaboliëten die zowel in AMB-R, SB-R en AMB-SB-R differentieel waren zijn N-acetyl-L-fenylalanine, caproylglycine en pyridoxine. De 7 die gemeenschappelijk waren voor PMM-R, SB-R en SB-PMM-R zijn (iso)leucyl-proline, pyridoxine, proline, 1-Pyrroline, X-hydroxy-hexaanzuur, X-oxohexaanzuur en mevalonaat.

#### 4.5 Kwantificatie van het percentage metacyclische parasieten

**Tabel 5** toont de percentages metacyclische parasieten bepaald a.d.h.v. k-means clustering. Dezelfde informatie staat grafisch voorgesteld in **figuur B17**. Er is geen significant verschil tussen WT (31%) en AMB-R (31%), MIL-R (16%), PMM-R (27%), SB-R (39%), AMB-PMM-R (25%), AMB-SB-R (18%), SB-PMM-R (20%) of WTO (22%) maar wel wanneer WT vergeleken werd met AMB-MIL-R (12%) of MIL-PMM-R (13%), waar een lager percentage metacyclo-genese werd vastgesteld. Het lijkt alsof deze dalende trend ook aanwezig al aanwezig is in MIL-R, maar minder uitgesproken.

**Tabel 5:** Het percentage metacyclische parasieten met hun betrouwbaarheidsinterval (BI) en de steekproefgrootte (N). De kolom *p*-waarde vergelijkt de behandeling met het WT. Bij significante verschillen ( $p < 0.05$ ) werd de *p* waarde vet gedrukt. Er werd gecorrigeerd voor meervoudig testen met Bonferroni.

Stam	Metacyclo-genese (%)	2.5%BI	97.5%BI	<i>p</i> -waarde	N
AMB-R	30.51	19.49	38.98	1.00	118
MIL-R	15.83	7.50	22.50	0.12	120
PMM-R	26.92	15.38	35.60	4.75	104
SB-R	38.83	24.75	48.54	1.00	103
AMB-MIL-R	12.30	4.92	18.85	<b>0.02</b>	122
AMB-PMM-R	25.00	14.00	34.00	1.00	100
AMB-SB-R	18.27	8.65	25.96	0.45	104
MIL-PMM-R	13.00	5.00	20.00	<b>0.04</b>	100
SB-PMM-R	20.00	10.00	28.00	0.65	100
WTO	22.00	11.50	31.00	1.00	100
WT	31.21	20.92	39.01	NA	141

#### 4.6 Biomerkerstudie

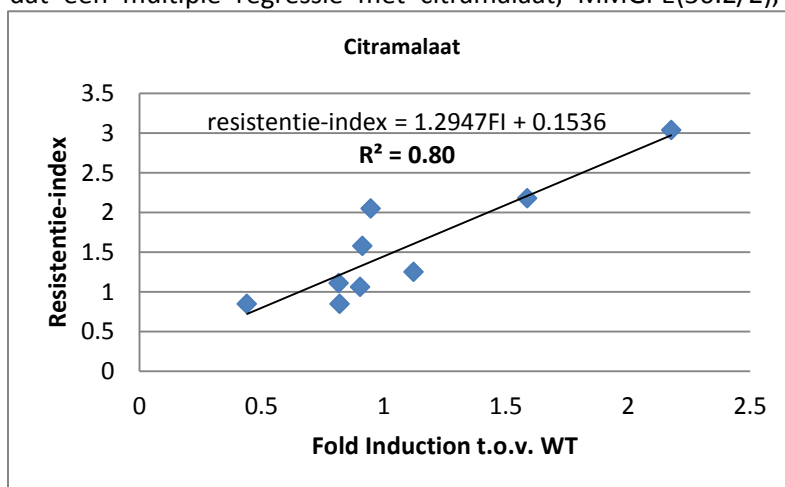
De  $R^2$  van de relatie tussen metaboliëtentensiteit en de resistentie-index tegen een bepaald geneesmiddel bleek een nuttige tool om interessante metaboliëten en patronen te identificeren. Een voorbeeld staat weergegeven in **figuur 14**. Vele vertoonden een  $R^2$  van 0.70 of hoger, dit zelfs wanneer ook de geneesmiddelcombinaties mee in rekening werden gebracht. Van deze combinaties wordt immers verwacht dat het profiel heel anders kan zijn dan simpelweg de additie van de metaboliëtoprofielen van de 2 geneesmiddelen apart.

Voor de correlatie met AMB-resistentie is het opvallend dat 8 van de 20 metaboliëten met de hoogste  $R^2$ , GPLs zijn. Het meest robuuste multiple regressiemodel ( $R^2=0.92$ ) dat verkregen kon worden bevatte 3-hydroxy-9,10-seco-cholestatriene-one en GPC(30:3/2). Het model bleek na

tweevoudige cross-validatie een gemiddelde kwadratische afwijking te hebben van slechts 0.046 in resistentie-index.

Er werden geen interessante groepen geïdentificeerd die correleerden met MIL-resistentie, noch kon er een robuust predictiemodel opgesteld worden.

Verscheidene metabolieten vertoonden een goede correlatie met SB-resistentie (**tabel B8**). De helft hiervan waren ook gestegen in AMB-SB-R en enkele ook in SB-PMM-R. Hieronder waren zeer veel vetzuren: 7-oxo-8-amino-nonaanzuur, X-hydroxy-hexaanzuur, X-oxo-hexaanzuur, succinaat-semialdehyde, 1,2-diacyl-sn-glycerol en 2-ketoglutaarzuur. Uit een tweevoudige cross-validatie bleek dat een multiple regressie met citramalaat, MMGPE(36:2/2), N-acetyl-L-fenylalanine, X-hydroxy-



hexaanzuur kon opgesteld worden dat een gemiddelde kwadratische afwijking had van 0.052 in resistentie-index.

**Figuur 14** (links): Illustratief voorbeeld (citramalaat) van een correlatie tussen FI en de resistentie-index (hier voor SB). De  $R^2$  van deze regressie werd telkens uit deze modellen geëxtraheerd en geïnterpreteerd.

De correlatie met PMM resistentie toonde dat 14 van de 20 metabolieten met de hoogste  $R^2$  GPLs zijn (**tabel B9**). Velen zijn niet-significant verhoogd in PMM-R en SB-R, maar de inducties worden hoger en significant in SB-PMM-R. 6 GPLs waren differentieel en 6 andere significant verhoogd. Ook in MIL-PMM-R en AMB-SB-R waren er heel wat verhogingen, waarvan 2 significant. Het waren op één na allemaal onverzadigde fosfolipiden. Andere metabolieten die een hoge  $R^2$  hadden waren o.a. hypoxanthine en 3-hydroxy-9,10-seco-cholestatriene-one.

#### 4.7 Bevindingen door manuele inspectie van de data

De resultaten in deze paragraaf werden gevonden door manuele inspectie van de lijst met FI in de verschillende stammen (**tabel B3**). Sommige patronen toonden hierbij een relatie tot één bepaald geneesmiddel en de combinaties hiermee. Andere resultaten waren gemeenschappelijk tussen verscheidene geneesmiddelen. Daarom worden er eerst per geneesmiddel en dan per pathway/groep moleculen deze bevindingen besproken. Voor PMM-R en SB-R apart werden geen interessante resultaten genoteerd die niet hierboven reeds besproken werden.

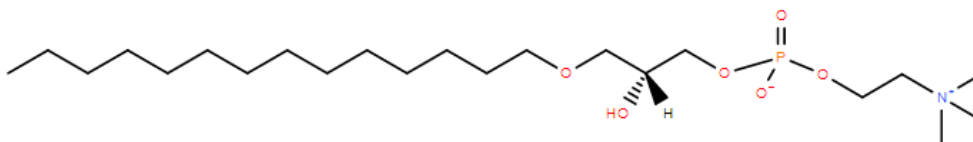
## 4.7.1 Individuele geneesmiddelen en hun combinaties

### 4.7.1.1 Amfotericine B

Zoals reeds in **tabel 4** aangetoond, gebeurden het meeste wijzigingen (12) in het GPL-metabolisme bij AMB-R. 6 GPLs vertoonden een differentiële stijging: GPC(20:1/1), GPC(18:1/1), GPC(20:2/1), GPC(15:1/1), GPC(O-34:2/2) en GPC(35:1/2). Anderzijds daalden 6 GPLs differentieel: GPC(33:3/2), GPC(36:7/2), GPC(40:10/2), GPE(39:7/2), GPC(32:4/2), GPE(35:3/2). Er is dus een opvallende daling aan onverzadigde en stijging aan verzadigde vetzuren. Ergosterol, het membraansterol waarmee AMB zou interageren, vertoonde in geen enkele stam significante wijzigingen.

### 4.7.1.2 Miltefosine

In alle MIL resistente stammen (MIL-R, AMB-MIL-R en MIL-PMM-R) werd het lipide GPC(O-14:0/1) gedetecteerd, terwijl in de andere stammen enkel ruis werd gedetecteerd bij deze massa. Het intensiteitsprofiel toont aan dat het om een glycerofosfolipide gaat dat minstens 2000x zoveel voorkomt in MIL-resistente stammen of misschien zelfs uniek is voor deze parasieten. Dankzij de accurateheid van de orbitrap is de massa van het lipide met zekerheid 453.32 Dalton en de brutoformule  $C_{22}H_{48}NO_6P$ . Ook de retentijd van 7min en 52s komt ook overeen met die van een GPC. De structuur heeft een etherbinding, geen dubbele bindingen en een vertakking (**fig. 14**). De lengte van de vertakking kan echter verschillen.



**Figuur 14:** Putatieve structuur GPC(O-14:0/1) uit Lipidmaps. De hydroxylgroep kan ook vervangen zijn door een verzadigde alkylketen, waarvan het aantal koolstoffen dan in mindering wordt gebracht van de huidige vetzuurstaart. Zo blijft isomerie behouden.

In MIL-R vertoonden ook 4 andere glycerofosfolipiden een differentiële stijging: GPE(38:3/2), GPC(O-34:3/2), GPC(O-34:2/2) en GPC(O-34:4/2). GPC(O-36:3/2) haalde de drempel net niet met een significante FI van 1.94. Samen met het MIL-unieke GPC zijn dit 5 van de 8 GPCs met een alkylgroep i.p.v. een acylgroep (monoalkylglycerofosfocholines) die in totaal aanwezig zijn in de dataset. Bovendien veranderde geen van 51 de GPCs zonder alkylgroep en slechts 1 van de 19 GPEs. In de combinaties vertoonden geen andere monoalkylglycerofosfocholines dan het unieke MIL- GPC(O-14:0/1) een wijziging. Ook andere GPCs en GPEs vertoonden geen significante wijzigingen met uitzondering van 2 GPCs die minstens tweevoudig gedaald waren in MIL-PMM (GPE(39:5/2) en GPC(36:5/2)).

In MIL-R vertoonden 3 vetzuren een significante FI van meer dan 2: 3-hydroxy-3-methyl-2-oxobutaanzuur, glyceraat, 7-oxo-8-amino-nonaanzuur. Itaconzuur vertoonde ook een FI groter dan 2,

maar niet significant. Deze vetzuren vertoonden geen wijzigingen in de combinatiebehandelingen met MIL.

## 4.7.2 Pathways

### 4.7.2.1 Tryptofaandegradatie

In de tryptofaandegradatiepathway (afbraak tryptofaan => indoolacrylaat via o.a. indoolpyruvaat en indoollactaat) stegen tryptofaan en indoolacrylaat meer dan een tweevoud (significant in MIL-R en AMB-SB-R) in AMB-R, MIL-R, SB-R en AMB-SB-R (**tabel 8**). Het is opvallende hoe goed de FI van de twee metabolieten in de verschillende stammen met elkaar overeenkomen.

**Tabel 8:** FI van de opgepikte metabolieten van de indool-acrylaatpathway. (Rood: FI>2 en vet:  $q < 0.05$  volgens Benjamini-Hochberg).

ID	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO
tryptofaan	3.22	3.44	1.29	2.12	1.42	1.36	2.58	0.94	0.89	1.42
indoolacrylaat	3.33	3.43	1.36	2.12	1.41	1.42	2.49	0.96	0.90	1.39

### 4.7.2.2 Acylglycines

Het acylglycine caproylglycine steeg significant in AMB-R PMM-R, SB-R en AMB-SB-R, terwijl valerylglycine steeg in AMB-R en het significant daalde in combinatiebehandelingen MIL-PMM-R en SB-PMM-R (**tabel 9**).

**Tabel 9:** FI van de opgepikte acylglycines (Rood: FI>2, blauw: FI<2 en vet =  $q < 0.05$  volgens Benjamini-Hochberg).

ID	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R
valerylglycine	1.97	0.80	1.11	1.32	0.64	0.99	1.17	0.43	0.38
caproylglycine	2.67	1.26	1.66	3.08	0.81	1.28	2.37	0.77	1.00

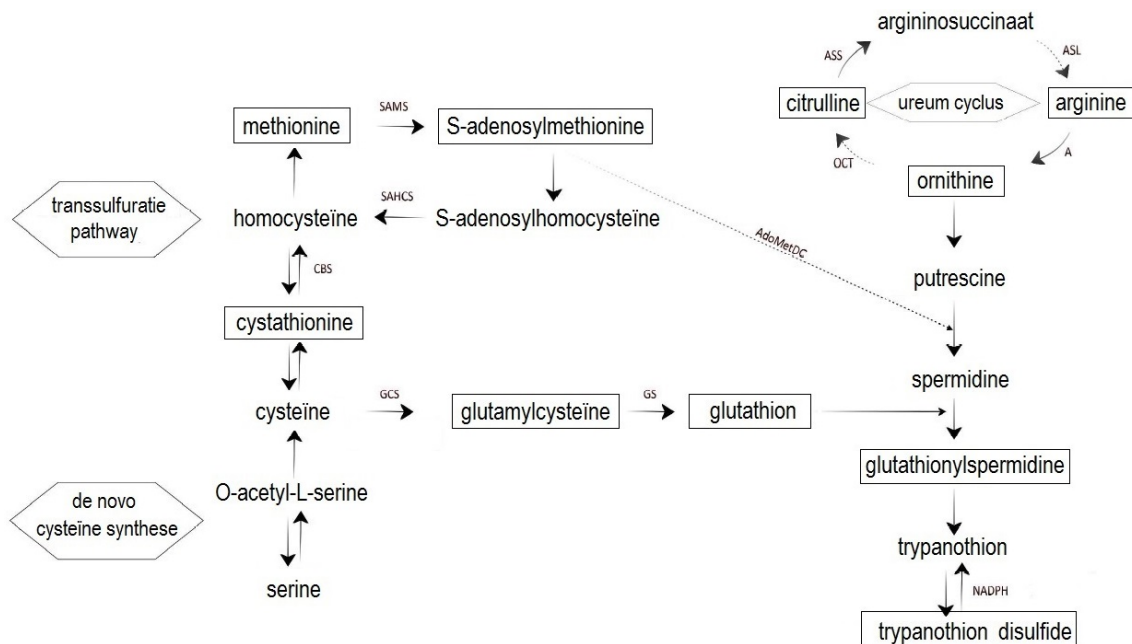
### 4.7.2.3 Proline metabolisme

Het patroon van proline is zeer opvallend. Deze metaboliet is in alle resistente stammen minstens 3 keer verhoogd t.o.v. het WT. Dit is significant in MIL-R, PMM-R, SB-R, AMB-SB-R, MIL-PMM-R en SB-PMM-R. In WTO is er ook een niet-significante tweevoudige FI van proline. Op **figuur B18-B27** staat het proline metabolisme en zijn gerelateerde pathways voorgesteld en wordt de link met het trypanothion metabolisme getoond. Uit deze figuren wordt ook duidelijk dat verscheidene metabolieten zoals ornithine, arginine en N-acetylorntithine, die behoren tot de omliggende pathways, gedaald zijn (trend tot, niet significant) in SB-R, SB-PMM-R- en MIL-PMM-R.

### 4.7.2.4 Trypanothion Productie

**Tabel B10** en de kaders op **figuur 15** tonen de metabolieten van de trypanothion pathway die werden opgepikt bij de MS-analyse. De data van de tabel werden per stam weergegeven op de pathway in **figuur B18-B27**. Het meest opvallende resultaat is dat in alle stammen met resistentie

tegen SB (SB-R, AMB-SB-R en SB-PMM-R) S-adenosylmethionine significant meer dan een tweevoud gestegen is. Dit geldt ook voor methionine in SB-R en AMB-SB-R. Voor de rest werden er geen significante wijzigingen vastgesteld, maar sporadisch waren er wel metabolieten die gemiddeld meer dan een tweevoud wijzigden t.o.v. het WT. De arginineconcentraties vertonen bijvoorbeeld opvallende variatie tussen de verschillende stammen met een FI van meer dan 2 in PMM-R en minder dan 0.5 in SB-R en MIL-PMM-R. Ornithine daalde een tweevoud in MIL-PMM-R en SB-PMM-R.



**Figuur 15:** Pathways die leiden tot de productie van trypanothion. De omkaderde metabolieten werden in de MS-analyse opgepikt. A: arginase; SAMS: S-adenosylmethionine synthetase; CBS: cystathionine- $\beta$ -synthetase, SAHCS: S-adenosyl-homocysteïne synthetase, GCS: glutamylcysteine synthetase; GS: glutathion synthetase, AdoMetDC: S-adenosylmethionine decarboxylase, OCT: ornithine carbamoyltransferase (niet aanwezig in Leishmania) en ASL: argininosuccinaat lyase (niet aanwezig in Leishmania). Aangepast uit Berg (2013, onder review).

#### 4.7.2.5 Aromatische aminozuren

De niveaus van alle aromatische aminozuren (tyrosine, fenylalanine en tryptofaan, **tabel B11, fig. B18-B27**) en N-Acetyl-phenylalanine waren gestegen in AMB-R. De laatste 2 bovendien ook in SB-R en AMB-SB-R. De FI zijn echter niet significant voor tryptofaan.

## 5 Discussie

In deze studie werden stammen onder geneesmiddeldruk bestudeerd. Dit zorgde er ten eerste voor dat het resistente fenotype niet verloren ging. Uit **figuur 7** is immers duidelijk dat dit anders zeker zou kunnen gebeuren. Ten tweede toonde een recente studie aan dat in de aanwezigheid van het geneesmiddel, de resistentiemechanismen duidelijker tot expressie komen. Dit was in deze studie van groot belang aangezien de stammen resistent tegen MIL en AMB, maar een matig verhoogde tolerantie t.o.v. het WT vertoonden (**fig.7**).

**Tabel 10:** Overzicht van de resultaten. Donkerblauw: pathway zeer opvallend betrokken met significante FI(s), lichtblauw: trend tot verandering in de pathway, maar niet zeer uitgesproken.

Proces	Pathway	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R
membraansamenstelling	GPLs									
bescherming oxidatieve stress	methionine recyclage									
	tryptofaan degradatie									
	proline									
mitochondriaal metabolisme	acylglycines									
energiemetabolisme	vetzuren									
	carbohydraten									

Op de heatmap (**fig. 11**) clusteren de meeste biologische replicaten van eenzelfde stam samen, wat een indicatie is voor de goede kwaliteit van de dataset. Een uitzondering hierop zijn WT en WTO die niet van elkaar kunnen onderscheiden worden. Sommige WT zijn zelfs meer gelijkend op een WTO dan op een andere WT. Hieruit kan worden afgeleid dat er geen substantiële metabolische wijzigingen zijn gebeurd gedurende de passages van WTO naar WT, of dat deze eerder subtiel zijn. Dit wordt bevestigd door het feit dat er geen enkele metabool gevonden kon worden die een significante FI van 2 of 0.5 (differentieel) had in WTO. Ook in de PCA (**fig. 12**) bevinden WT en WTO zich samen in 1 wolk, wat erop wijst dat de WTO (moederstam) een stabiel metabolisch profiel had en dat de wijzigingen in de geneesmiddel-resistente stammen te wijten zijn aan geneesmiddelenstress en niet aan het verschil in passages. Het clustering algoritme bleek niet in staat alle biologische replicaten van PMM-R en AMB-PMM-R te clusteren per stam. Ook de PCA was hiertoe niet in staat. Aangezien beiden rekening houden met alle metaboolen in de dataset wil dit zeggen dat de verschillen tussen deze stammen onderling eerder subtiel zijn t.o.v. de random variatie tussen de stammen. Het resistentiemechanisme van PMM en AMB-PMM bestaat dus waarschijnlijk uit de wijziging van een relatief klein aantal cruciale metaboolen. Een andere mogelijkheid is dat we de metaboolen die sterk gewijzigd zijn in deze stammen niet gedetecteerd zijn of dat resistentie zich enkel op een andere functioneel niveau afspeelt (vb.proteoom, zie 5.1.4 en 5.6). De WT-, WTO-, PMM-R- en AMB-PMM-R-cluster is bovendien opgesplitst in 2 delen. Dit is een typisch nadeel van de

stapsgewijze methodiek van het hiërarchische clusteren (eenmaal er een 'foute' clustering gebeurt kan het algoritme niet meer terug naar een betere oplossing) en geen reden om te twijfelen over de kwaliteit van de dataset. Op de PCA-plot is dit bijvoorbeeld niet zichtbaar.

In de volgende secties worden eerst de bevindingen besproken die uniek zijn voor resistentie tegen een bepaald geneesmiddel. Vervolgens worden de wijzigingen besproken die gedeeld worden tussen verschillende resistente stammen. Tot slot wordt resistentie tegen geneesmiddelcombinaties besproken.

## 5.1 Metabolische patronen die gelinkt kunnen worden aan één bepaald geneesmiddel

### 5.1.1 Trivalente Antimonialen

SB-R vertoonde een relatief hoog aantal differentiële metaboliëten (29), waarvan een aanzienlijk deel (7) zich bevond in de categorie vetzuren (**tabel 3** en **tabel 4**). Verscheidene van deze vetzuren vertoonden een extreem hoge FI (**tabel B4**). Het is opmerkelijk dat een organisme onder stress investeert in moleculen die een hoge energetische inhoud hebben. Deze opslag van vetzuren werd ook teruggevonden in een recente metabolomics-studie op Nepalese *L. donovani* stammen met een natuurlijke resistentie tegen SB (Berg et al., onder review): promastigoten van de SSG-resistente BPK275 vertoonden in stationaire fase differentieel verhoogde niveaus van de drie vetzuren 7-oxo-8-amino-nonaanzuur, X-oxo-hexaanzuur en glyceraat t.o.v. de sensitieve controle BPK282, terwijl slechts 1 vetzuur was gedaald. Wanneer BPK275 werd blootgesteld aan pentavalente antimonialen steeg dit aantal toegenomen metaboliëten zelfs tot 6. Het blijkt dus een wijziging te zijn die aanwezig is bij SB-resistente parasieten, maar nog meer uitgesproken wordt wanneer het geneesmiddel aanwezig is in het medium.

Het is aangetoond dat antimonialen de  $\beta$ -oxidatie van vetzuren (en de glycolyse) kunnen inhiberen en dit voor de omzetting tot acetaat (Herman et al., 1987). Het is dus enerzijds niet verwonderlijk dat hier wijzigingen geobserveerd worden. Anderzijds is de parasiet nu in staat deze inhibitie te overleven door zich op een of andere manier aan te passen. Bovendien was, zoals hierboven vermeld, de toename in vetzuren ook zichtbaar bij BPK275 in afwezigheid van SB, wat erop wijst dat de stijging eigen is aan het resistent fenotype en niet enkel een gevolg van blootstelling aan het geneesmiddel.

Vetzuren worden vooral gebruikt als energiebron door het amastigote stadium (Rosenzweig et al., 2008). Promastigoten leven eerder van glucose en aminozuren (Rosenzweig et al., 2008). De overgang wordt gekenmerkt door toegenomen hoeveelheden enzymen die betrokken zijn in de  $\beta$ -

oxidatie, de krebscyclus, de mitochondriale respiratorische keten en de oxidatieve fosforylatie (Rosenzweig et al., 2008). Een grotere voorraad aan vetzuren kan dus een belangrijk voordeel opleveren voor de parasiet op het moment dat hij moet overleven in macrofagen zonder dat hiervoor grote metabolische aanpassingen nodig zijn. In de huidige studie werd echter gewerkt met *in vitro* resistente parasieten die nooit de selectiedruk van antimoniaalen in macrofagen ondergingen. De oorzaak van de geobserveerde verhoging van vetzuren moet hier dus elders gezocht worden, terwijl dit bij de natuurlijke resistentie misschien wel een rol kan hebben gespeeld. Of een secundair selectief voordeel kan opgeleverd hebben.

Vetzuren zijn ook bouwstenen voor GPLs. De GPL bouwsteen glycerol-3-fosfaat was differentieel verhoogd in AMB-SB-R en SB-PMM-R en significant 1.94 keer gestegen in SB-R (**tabel B5**). Dit wijst mogelijk op een verhoogde flux doorheen de pathways voor de aanmaak van GPLs. Uitgesproken verhogingen van GPLs werden echter niet geobserveerd in AMB-SB-R of SB-R (en ook niet in PMM-R), maar wel in de combinatiebehandeling SB-PMM-R (**tabel 4**). Ook de klasse carbohydraten en conjugaten vertoonde veel differentieel gestegen metabolieten in de dubbel resistente lijnen met SB-resistentie (AMB-SB-R en SB-PMM-R). Aangezien SB zoals eerder vermeld ook een effect heeft op de glycolyse is ook dit een interessante bevinding.

Een andere bemerking in verband met de SB-R stammen is dat sedoheptulose-7-fosfaat en nt-pentose ring differentieel verhoogd waren (**tabel B5**). Dit zijn allebei componenten van de pentose fosfaat pathway (PPP) waarvan de nt-pentose ring het eindproduct is (Barrett, 1997). Hun verhoging wijst op meer activiteit van dit systeem. De pentose fosfaat pathway genereert NADPH, dat cruciaal is om oxidanten te reduceren zoals trypanothion. Ook in stammen met een natuurlijke resistentie tegen SB werd deze inductie van de PPP reeds waargenomen (Berg et al., onder review).

### 5.1.2 Amfotericine B

Geen enkele andere stam vertoonde zoveel wijzigingen in GPL-inhoud als AMB-R. Dit zou verklaard kunnen worden door het actiemechanisme van AMB dat inwerkt op de membraan. 6 van de 81 gedetecteerde GPLs waren differentieel gestegen en 6 anderen gedaald (**tabel 4**). Bovendien waren 8 van de 20 metabolieten die de hoogste correlatie vertoonden met AMB-resistentie ook GPLs. Er was een stijging van het aantal verzadigde GPLs, en een daling van de onverzadigde. Dit zou kunnen wijzen op een daling van de membraanfluiditeit, al is de betekenis hiervan nog niet duidelijk (Berg et al., onder review). Ook werd het tegendeel reeds aangetoond voor *in vitro* en *in vivo* AMB-R stammen, wat de interpretatie nog moeilijker maakt (Mbongo et al., 1998; Purkait et al., 2012).



Ook het sterol 3-hydroxy-9,10-seco-cholestatriene-one (vitamine D3 derivaat) bleek een sterke associatie te vertonen met AMB-resistentie aangezien het niet enkel een stijging vertoonde in de enkelvoudige AMB-resistente lijn, maar ook in alle combinaties.

Inderdaad werd reeds in de inleiding besproken dat AMB vermoedelijk verstoringen in de membraan teweegbrengt door te interageren met het membraansterol ergosterol. Interessant is dat ergosterol zelf noch in AMB-R, noch in de combinaties een wijziging in concentratie vertoonde. Anderzijds is het wel mogelijk dat ergosterol vervangen werd door zijn isomeer ergosta-5,7,24(28)-trien-3- $\beta$ -ol zoals dat reeds eerder gebeurde bij *in vitro* resistentie tegen AMB. Dit kan echter niet gedetecteerd worden door massaspectrometrie omdat de 2 moleculen exact dezelfde massa hebben.

### 5.1.3 Miltefosine

GPC(O-14:0/1) kwam minstens 2000x meer voor in alle MIL-resistente stammen en viel bovendien bij de andere onder de detectielimiet, wat zou kunnen betekenen dat het er niet voorkomt. Verscheidene hypothesen zijn mogelijk. Een eerste mogelijkheid is dat het contaminatie was die aanwezig was in de batch MIL. Echter, het geïdentificeerde GPC bleek geen van de meest voorkomende bijproducten van de syntheseweg van MIL te zijn (met een 2 koolstoffen langere of kortere vetzuurketen), maar het kan voorlopig niet volledig uitgesloten worden dat het hier toch om een onzuiverheid in de batch MIL gaat (Dr. Robert Vinson, Director Product development Paladin, pers. comm.). Er wordt dus momenteel een opvolgexperiment gepland waarin een LC-MS analyse zal worden uitgevoerd van de batch MIL. Als onzuiverheid inderdaad kan worden uitgesloten, dan gaat het waarschijnlijk om een natuurlijk glycerofosfolipide dat opgereguleerd werd in alle MIL-resistente stammen. Het is immers bekend dat MIL een invloed heeft op de lipidsamenstelling via inhibitie van de enzymen die betrokken zijn bij de synthese van fosfolipiden, aangezien MIL een substraatanoloog is (Lux et al., 2000; Rakotomanga et al., 2005). Een derde mogelijkheid is dat het een onrechtstreekse metaboliet van MIL is. Het zou kunnen dat de resistente parasiet in staat is MIL af te breken in alkanol en fosfocholine en vervolgens de fragmenten recycleert om eigen fosfolipiden op te bouwen. Dit zou zeer eenvoudig aan te tonen zijn door het experiment te herhalen met <sup>13</sup>C-MIL. Hoe dan ook is het een interessante bevinding die het opvolgen waard is, omdat er zeer weinig geweten is van de effecten van MIL op *Leishmania* en nog minder van het resistentiemechanisme. Een lipide dat enkel in MIL-resistente stammen te vinden is kan dus een goed ankerpunt zijn voor verdere studies.

Naast GPC(O-14:0/1) zijn er ook nog 4 andere monoalkylglycerofosfocholines differentieel gestegen. Omdat dit in geen enkele andere resistente stam geobserveerd werd en bovendien gewone GPCs geen wijzigingen in concentratie vertoonden, doet dit sterk vermoeden dat MIL een invloed heeft op

het mechanisme dat verantwoordelijk is voor het produceren van deze moleculen. Het werd inderdaad recent aangetoond dat specifiek dit type GPCs verhoogd waren in Nepalese en Indiase stammen die *in vitro* geïnduceerd waren om MIL-resistent te zijn (Dujardin J.C., pers. comm.)

Een vorige studie toonde aan dat de concentratie aan GPE's verhoogt en die van GPCs verlaagt in reactie op MIL-blootstelling van *L. donovani* als gevolg van de inhibitie van PE-N-methyltransferase (Rakotomanga et al., 2005). Dit werd echter niet geobserveerd in deze studie.

#### 5.1.4 Paromomycine

Er waren slechts 14 differentiële metabolieten aanwezig in PMM-R vergeleken met WT (**tabel 3**), wat bijzonder opmerkelijk is aangezien het één van de meest resistente stammen in de dataset was met een resistentie-index van 11. Het toont aan dat de aanpassingen gebeurden in een deel van het metabooloom dat niet gedetecteerd werd of dat er simpelweg weinig aanpassingen hebben plaatsgevonden. Ook de PCA ondersteunt dit omdat PMM-R deel uitmaakt van de centrale cluster (**fig. 12**). Een mogelijke verklaring is dat er voor de geneesmiddelenstress reeds op het proteoomniveau gecompenseerd wordt, waardoor weinig wijzigingen doordringen tot het metabooloom. Proteoomanalyse van stammen met *in vitro* resistentie tegen PMM heeft immers aangetoond dat deze parasieten de aanmaak van ribosomale proteïnen verhogen, wat zou compenseren voor het feit dat PMM op de ribosomen bindt en deze blokkeert (Chawla et al., 2011).

Het werd ook al aangetoond dat PMM veel trager wordt opgenomen in PMM-R stammen (Maarouf et al., 1998). Mogelijk heeft dit te maken met associatie van PMM met de membraan aangezien gebleken is dat deze essentieel is voor de opname van PMM in *Leishmania* (Jhingran et al., 2009). Wijzigingen met betrekking tot de membraan werden inderdaad gedetecteerd in de huidige studie. Bij de 20 meest correlerende metabolieten met PMM-resistentie ( $R^2$ ) bevonden zich niet minder dan 14 GPLs (**tabel B9**). Het betreft hier 13 GPCs en één GPE, waarbij vertakte vormen duidelijk overgerepresenteerd zijn. Bovendien komt ook het membraansterol 3-hydroxy-9,10-seco-cholestatriene-one naar boven in deze lijst als negatief correlerend.

## 5.2 Mechanismen die gedeeld worden tussen geneesmiddelen

### 5.2.1 Beschermen aromatische aminozuren en indool-acrylaat tegen oxidatieve stress in AMB-R, SB-R en hun combinatie?

#### 5.2.1.1 Aromatische aminozuren

Er werd reeds vermeld dat PC3 AMB-R, SB-R en AMB-SB-R duidelijk scheidt van de rest. Bij de belangrijkste loadings van deze component bevinden zich de aromatische aminozuren fenylalanine (positie 5, van groot naar klein) tryptofaan (pos. 13) en tyrosine (pos. 23), alsook het derivaat N-

acetylphenylalanine (pos .1). Ook methionine (pos. 7) bevindt zich hoog in de lijst van loadings. Met uitzondering van tryptofaan (wel  $FI > 2$ ) zijn ze de aromatische aminozuren allemaal significant verhoogd in AMB-R en N-acetylphenylalanine in alle drie de stammen (**tabel B10** en **tabel B11**). Voor zover bekend in de literatuur staan aromatische aminozuren in trypanosomatiden enkel in voor 2 belangrijke processen: de eiwitsynthese en transaminatiereacties (Berger et al., 1996).  $^{15}N$ -tyrosine toonde reeds aan dat dit aminozuur in staat is zijn aminogroep door te geven aan 2-keto-4-methylthioboterzuur (KMTB) met de vorming van methionine, welke ook door PC3 naar voren werd geschoven (Berger et al., 1996). Deze reactie is een onderdeel van de recyclage van methionine uit 5'-S-methyl-5'-thioadenosine (MTA) (Berger et al., 1996). MTA wordt gevormd uit gedecarboxyleerd S-adenosylmethionine (dSAM) na overdracht van een aminopropylgroep naar putrescine (Berger et al., 1996). Putrescine wordt zo omgezet in spermidine (deze werd niet gedetecteerd), de voorloper van trypanothion, die zoals reeds in de inleiding besproken een cruciale beschermer is tegen oxidatieve stress. Hierbij kan dus de hypothese worden geponeerd dat de parasiet via een verhoging van methionine, SAM (verhoogd in SB-R en AMB-SB-R) en aromatische aminozuren via transaminatie de flux doorheen de methionine-cyclus kan verhogen, wat leidt tot een hogere productie van trypanothion (niet gedetecteerd) en een betere bescherming tegen oxidatieve stress. Thiolen zoals trypanothion zijn in dit soort experimenten steeds moeilijk te detecteren aangezien ze tijdens de extractie en analyse kunnen oxideren tot hun disulfiden (Berg et al., onder review). Deze disulfiden reflecteren dan de totale thiol-inhoud (gereduceerd en geoxideerd samen). Trypanothion disulfide vertoonde echter ook nergens wijzigingen, maar dit sluit zeker niet uit dat er een verhoogde aanmaak is omdat SB een hoge efflux veroorzaakt.

Het mechanisme dat hierboven werd voorgesteld, wordt ondersteund door het feit dat SB en AMB inderdaad geneesmiddelen zijn die geassocieerd worden met oxidatieve stress, terwijl dit voor MIL en PMM niet geweten is (dit werd uitgebreid besproken in de inleiding). SB is immers in staat om een depletie van thiolen te veroorzaken waardoor er oxidatieve stress in de cel ontstaat (*in vivo* versterkt door de oxidatieve stress afkomstig van de afweer van de gastheer). Een verhoogde aanmaak van trypanothion zou dus kunnen compenseren voor een 1) een deel van de thioefflux veroorzaakt door SB, 2) de verminderde omzetting van trypanothion disulfide naar trypanothion door inhibitie van trypanothion reductase door SB. In geval van AMB is het geweten dat het kan auto-oxideren en oxidatieve stress kan veroorzaken. Het verhogen van tolerantie t.o.v. oxidatie stress lijkt dus een interessante strategie om resistentie tegen dit geneesmiddel op te wekken.

Opmerkelijk is dat de verhoging van aromatische aminozuren ook aangetoond werd in stammen die een natuurlijke resistentie vertonen tegen antimoniaalen. In een studie van Berg et al. (onder review) vertoonde de SSG-resistente stam sterk verhoogde levels tryptofaan, phenylalanine en tyrosine t.o.v.

de sensitieve stam BPK282 in stationaire fase. Wanneer BPK275 werd blootgesteld aan SB verhoogde deze aminozuren nog verder. Ook SAM en methionine verhoogden wanneer SB werd toegevoegd aan het medium. Deze resultaten ondersteunen dus tevens onze eigen bevindingen.

#### 5.2.1.2 Indool Acrylaat

Een andere interessante metaboliet die uit de loadings van PC3 van AMB-R, SB-R en AMB-SB-R naar voren kwam was indool-acrylaat. Dit is een afbraakproduct van tryptofaan en wordt in *E.coli* geassocieerd met het in gang zetten van de respons tegen oxidatieve stress en het vormen van een persister-subpopulatie (Vega et al., 2012). Dit zijn cellen die dormant zijn en geassocieerd worden met terugkerende infecties (Vega et al., 2012). Recent werd de hypothese geopperd dat het mechanisme ook een rol zou spelen in *Leishmania* nadat een natuurlijke SB-resistente stam zowel in als zonder de aanwezigheid van SB een significante verhoging vertoonde van zowel tryptofaan als indoolacrylaat (Berg et al., onder review). In de huidige studie wordt niet enkel een verhoging (FI>2, niet altijd significant) van beide metabolieten in SB-R, maar ook in MIL-R, AMB-R, en AMB-SB-R waargenomen (**tabel 8**).

#### 5.2.2 Proline, een veelzijdige metaboliet in *Leishmania*

Proline vertoonde een opvallende hoge stijging in alle resistente stammen tegen MIL, PMM, SB en hun combinaties. Ook in WTO was er een (niet-significante) en weliswaar minder uitgesproken trend tot stijging. Dit toont aan dat er zonder geneesmiddelenstress ook al behoorlijk wat variatie op de prolineniveaus zit, wat doet vermoeden dat het een flexibele pathway is. Proline wordt in gisten, planten, en vele andere organismen geassocieerd met bescherming tegen oxidatieve stress. Proline op zich kan niet enkel proteïnen stabiliseren, maar is zelf ook in staat vrije hydroxylradicalen te neutraliseren (Matysik et al., 2002). Het aminozuur heeft bovendien een speciale rol in trypanosomatiden. Het is een van de meest abundante aminozuren in het heamolymfe van de vector en samen met alanine en glutamaat worden er in de parasiet grote pools proline aangelegd als osmoliet (Bringaud et al., 2012). Proline wordt bovendien door *Leishmania* gebruikt als alternatieve koolstofbron. Het kan omgezet worden naar glutamaat en dan naar alpha-ketoglutaraat, waardoor energieproductie via de krebscyclus mogelijk wordt (Bringaud et al., 2012). Er is ook een mogelijke link tussen proline en de differentiatie van promastigoten naar amastigoten. In de zure pH van de macrofagen (en stationaire culturen van promastigoten) werkt de belangrijkste prolinetransporter namelijk veel minder efficiënt (Zilberstein & Gepstein, 1993). Men vermoedt dat dit mogelijk een trigger-sigitaal kan zijn voor differentiatie (Zilberstein & Gepstein, 1993). Het feit dat deze metaboliet in zoveel processen betrokken is, maakt enerzijds zijn stijging in alle resistente stammen een interessant fenomeen, maar bemoeilijkt tevens de interpretatie. De rol van proline kan dus uitsluitend opgehelderd worden door follow-up studies: <sup>15</sup>N-proline aan het medium toevoegen

gevolgd door metabolomics zou bijvoorbeeld kunnen aantonen of het een verhoogde opname, een verminderde afbraak, of een verhoogde synthese is die zorgt voor de stijging van intracellulair proline. Indien er inderdaad ook afbraak is, zou het bovendien ook toelaten dit door de hele cel te volgen. Anderzijds zou men de LdAAP24 alanine/proline transporter kunnen uitschakelen (een knock-out voor de transporter bestaat reeds in Zilberstein Lab, Israel Institute of Technology) omdat recent werd ontdekt dat het de enige transporter is die bijdraagt aan de intracellulaire pool van proline (Inbar et al., 2013). Indien effectief blijkt dat een hogere opname verantwoordelijk is voor de stijging voor proline, kan dit bovendien gevolgd worden door infectie-experimenten om te evalueren of het blokeren van de transporter inderdaad ook een effect heeft op de resistentie tegen AMB en/of SB.

Interessant is dat deze stijging van proline ook werd geobserveerd in stammen met een natuurlijke resistentie tegen antimonialen (Berg et al. 2013, onder review). Hier was er in tegenstelling tot onze bevindingen echter ook een verhoogde concentratie van pyrroline carboxylaate, arginine, ornithine (hier enkel in PMM), en putrescine aanwezig. Dit zijn allemaal metabolieten die voorlopers zijn van spermidine dat tot de synthese van trypanothion leidt. Misschien kan een verhoogde prolineopname dus ook leiden tot verhoogde trypanothionsynthese, maar dat moet uiteraard ook blijken uit een follow-up studie.

### 5.2.3 Acylglycines

De verhoging van caproylglycine in de SB-R (en AMB-SB-R) komt overeen met de bevindingen van Berg et al. (onder review) (**tabel 9**). De inductie van valerylglycine is echter niet reproduceerbaar in de huidige studie. In AMB-R waren beiden echter wel verhoogd en caproylglycine zelfs ook in AMB-SB-R. Ook hier is dus weer een mogelijke link tussen het SB- en AMB-actie/resistentiemechanisme.

Acylglycines worden gevormd wanneer glycine geconjugeerd wordt met een acyl groep door het mitochondriale enzyme glycine-N-acylase. In Eukaryoten gebeurt dit als er een disfunctie ontstaat van acyl-coA dehydrogenases (verantwoordelijk voor de  $\beta$ -oxidatie van vetzuren) waardoor de acylgroepen moeten afgevoerd worden via acylglycines (Kompore & Rizzo, 2008). Deze observatie wijst dus hoogstwaarschijnlijk op een wijziging van het mitochondriaal metabolisme in deze stammen.

## 5.3 Geneesmiddel combinaties

Met de zeer beperkte kennis van geneesmiddelenwerking en -resistentie in *Leishmania* was het ingewikkeld om de geobserveerde patronen te interpreteren. Desalniettemin waren er enkele interessante observaties.

In de eerste plaats was het opvallend dat in sommige geneesmiddelencombinaties minder metabolieten gewijzigd waren dan in sommige enkelvoudig-resistente stammen. Het gaat hier om AMB-MIL-R met slechts 3 differentiële metabolieten, AMB-PMM-R met 5 en MIL-PMM-R met 11 (**tabel 3**). Dit is een verrassend resultaat aangezien de stress die de organismen ondervinden hoger moet zijn omdat er nu 2 geneesmiddelen gecombineerd worden. Bovendien is dit geen gevolg van een lagere resistentie-index aangezien deze gelijk of hoger was. Het toont ook aan dat de metabolische wijzigingen als gevolg van geneesmiddelwerking en/of –resistentie niet additief zijn. Anders zou men verwachten dat het aantal differentiële metabolieten in de buurt zou liggen van de som van alle metabolieten die differentieel zijn in één of beide enkelvoudig resistente stammen. Mogelijk gaat het hier dus om een totaal andere soort van resistentie. Bij de SB-PMM-R werden de meeste (50) differentiële metabolieten geobserveerd, terwijl bij AMB-SB-R (31) er ongeveer evenveel waren als in de enkelvoudig resistente stammen (AMB-R: 32, SB-R: 29). Het zijn dan ook deze laatste die de meest interpreteerbare patronen vertoonden.

Zoals eerder vermeld vertoonden AMB-R en SB-R een aantal gelijkenissen en deze leken terug te komen in AMB-SB-R, wat suggereert dat de mechanismen gelijkaardig zijn. 1) AMB-SB-R werd net als AMB-R en SB-R door PC3 gescheiden van de andere stammen. 2) S-adenosyl-methionine en methionine waren differentieel gestegen in AMB-SB-R en ook aromatische aminozuren vertoonden stijgingen in AMB-R, SB-R en AMB-SB-R. Dit wijst ook op wijzigingen duidt ter hoogte van de methionine cyclus. 3) De niveaus van indoolacrylaat en tryptofaan waren net als bij AMB-R en SB-R gestegen (tryptofaan wel tweevoudig, maar niet significant). 4) De verhoging van acylglycines die mogelijk wijst op een wijziging in het mitochondriaal metabolisme. Toch moeten er nog mechanismen zijn die belangrijk zijn voor de resistentie tegen AMB en/of SB uitmaken. Uit **tabel B1** blijkt immers dat SB-R stammen geen kruisresistentie vertonen tegen AMB en AMB-R stammen zelfs 0.85 maal gevoeliger zijn voor SB dan het WT. Inderdaad werden er ook wijzigingen gedetecteerd die specifiek voorkwamen in SB-resistente stammen (vetzuren en carbohydraten) en de membraanwijzigingen in SB-R en SB-PMM-R waren niet dezelfde als die in AMB-R.

Een opmerkelijke observatie is dat PMM-R een verhoogde tolerantie had voor SB en vice versa heeft SB-R dit ook voor PMM (**tabel B1**). Er is dus zeer waarschijnlijk een link tussen de twee resistentiemechanismen. Vermoedelijk bevindt deze interactie zich ter hoogte van de membraan aangezien bij beiden wijzigingen in membraanmetabolieten werden geobserveerd. Bovendien was de reeks GPLs die een correlatie vertoonden met PMM-resistentie opvallend verhoogd in SB-PMM-R en vertoonden ze ook een, weliswaar minder uitgesproken, trend tot verhoging in SB-R en PMM-R (**tabel B9**).

## 5.4 Metacyclogenese

Een recente studie toonde aan dat parasieten die geïsoleerd werden uit patiënten behandeld met MIL, een hogere tolerantie vertoonden tegen MIL (Prajapati et al., geaccepteerd). De sleutelvraag was dan ook waarom MIL-resistentie zich nog niet heeft kunnen ontwikkelen. De lagere metacyclogenese die hier geobserveerd werd in de MIL-resistente stammen wijst erop dat deze stammen misschien minder goed in staat zijn een infectie te veroorzaken, wat hun verspreiding (na hun generatie in de behandelde patient) kan beperken.

## 5.5 Besluit

In deze thesis werden de metabolische wijzigingen in de verschillende resistente stammen uitvoerig bestudeerd en werd er bovendien getracht interessante hypothesen te genereren omtrent de werking van de geneesmiddelen en de resistentiemechanismen van de parasiet. De metaboliëprofielen bleken inderdaad een grote hoeveelheid en verscheidenheid aan relevante informatie te bevatten.

De resistentie tegen trivalente antimonialen kon gelinkt worden aan de stijging van een hele reeks vetzuren. Dit zou een gevolg kunnen zijn van het feit dat antimonialen de  $\beta$ -oxidatie inhiberen en/of de parasiet extra bouwstenen aanmaakt voor de productie van GPLs. Deze laatste mogelijkheid wordt ondersteund doordat glycerol-3-fosfaat, een sleutelcomponent in de synthese van deze GPLs, gestegen was in alle behandelingen met SB. Een grotere voorraad vetzuren zou in de tweede plaats ook een voordeel kunnen betekenen voor de overleving als amastigoot, waar de energieproductie vooral afhangt van  $\beta$ -oxidatie.

AMB-R vertoonde opvallende veranderingen in GPL-niveaus (zowel stijgingen als dalingen), wat consistent is met het feit dat AMB zijn actie uitvoert door te interageren met het membraansterol ergosterol. Ook bij PMM-resistentie spelen GPLs waarschijnlijk een belangrijke rol aangezien 14/20 meest correlerende metaboliëten met de PMM-resistentie-indices GPLs waren. Eveneens bij MIL-R gebeurden er wijzigingen in het metabolisme van de membraanlipiden. Het GPC(O-14:0/1) werd enkel aangetroffen in MIL-resistente stammen. Dit kan het gevolg zijn van het feit dat MIL een substraatanaaloo is van enzymen die betrokken zijn bij de synthese van fosfolipiden en zo een bepaald enzym inhibeert. Anderzijds is het ook mogelijk dat de parasiet in staat is MIL om te zetten in alkanol en fosfocholine en vervolgens de fragmenten recycleert om zijn eigen fosfolipiden op te bouwen. Het was ook opvallend dat uitsluitend de monoalkylglycerofosfocholines stegen in MIL-R.

Het was zeer duidelijk dat de resistentiemechanismen niet additief waren. AMB-MIL-R, AMB-PMM-R en MIL-PMM-R hadden zelfs minder differentiële metaboliëten dan eender welk van de enkelvoudig resistente stammen. Andere geneesmiddelcombinaties toonden dan weer aan dat er de parasiet zich

tegen verschillende geneesmiddelen op een gelijkaardige manier kan aanpassen. Het profiel van AMB-R en SB-R bleek immers op verscheidene punten een overlap te vertonen, wat gereflecteerd werd in AMB-SB-R. Evenwel vertoonden AMB-R en SB-R geen kruisresistentie tegen respectievelijk SB of AMB. De volgende metabolische gelijkenissen werden aangetroffen. 1) Veranderingen in de methionine-recyclage-cyclus: De stijging van aromatische aminozuren (AMB-R, SB-R en AMB-SB-R) die belangrijk zijn als aminogroepdonoren voor de vorming van methionine in de methionine-cyclus, De stijging van methionine en SAM zelf in SB-R en AMB-SB-R. Mogelijk stimuleert de parasiet zo de productie van trypanothion wat bij AMB-R kan compenseren voor de vrije radicalen die AMB veroorzaakt en bij SB voor de thiol efflux en de verminderde activiteit van trypanothion reductase. 2) de verhoogde activiteit van de tryptofaan degradatie pathway die geassocieerd wordt met het in gang zetten van pathways die beschermen tegen oxidatieve stress. Kruisresistentie toonde bovendien aan dat er vermoedelijk ook een overlap is in de mechanismen van SB-R en PMM-R. Inderdaad werd in deze studie een serie GPLs geïdentificeerd die bescheiden gestegen waren in SB-R en PMM-R en opvallend in SB-PMM-R.

In alle stammen die resistent waren tegen AMB, SB, PMM of hun combinaties werd een stijging van de prolineniveaus geobserveerd. De concentraties proline lijken erg flexibel te zijn en ook proline zelf wordt geassocieerd met een verscheidenheid aan functies zoals de bescherming tegen oxidatieve stress, regulator van differentiatie, osmoliet en energiebron.

De stijging van vetzuren, aromatische aminozuren, methionine, SAM, proline en caproylglycine in SB-R kwamen allemaal overeen met een recent experiment op stammen met een natuurlijke resistentie tegen antimonialen. Bovendien werd de stijging van monoalkylglycerofosfocholines in MIL-R ook teruggevonden in een studie op *in vitro* resistente stammen. Dit is opmerkelijk aangezien het genetische verschil tussen die Nepalese stammen en de Ethiopische stammen uit deze studie erg groot is en MIL-R een zeer lage resistentie-index had. Deze informatie verhoogt dus niet enkel de confidentie van de gevonden resultaten, maar toont ook de waarde van experimenten met *in vitro* geïnduceerde resistentie aan.

Deze grote verscheidenheid aan bevindingen maakt duidelijk dat untargeted metabolomics-studies uitermate geschikt zijn om op te sporen welke metabolische pathways belangrijk zijn voor geneesmiddelenwerking- of resistentie. De gegevens uit deze studie onderbouwden niet enkel bestaande hypothesen, ook werden er nieuwe, veelbelovende doelwitten gevonden voor verdere studies. Bovendien levert al deze informatie een bijdrage tot de huidige kennis over geneesmiddelenresistentie bij *L. donovani*, dewelke essentieel is om de parasiet voor te blijven in de nooit eindigende wapenwedrace tussen resistentie en geneesmiddelenontwikkeling.



## 5.6 Toekomstperspectief

Niet alle stammen hadden een uitgesproken metabolietprofiel in deze studie. AMB-MIL-R, MIL-PMM-R en PMM-R vertoonden zo bijvoorbeeld een onduidelijke scheiding op de PCA en weinig differentiële metabolieten, hoewel ze minstens een dubbel zo hoge concentratie geneesmiddel verdroegen als het WT. Andere stammen zoals AMB-R hadden wel een duidelijk profiel bij deze resistentiewaarde. Het feit dat er soms weinig wijzigingen in het metabooloom te vinden zijn is niet verwonderlijk aangezien het best mogelijk is dat de stammen in staat zijn het effect van het geneesmiddel te blokkeren vanuit een ander functioneel niveau zoals het proteoom. Er zijn immers veel mogelijkheden te bedenken waarom het geneesmiddel plots niet meer zou werken (mutatie van de targets van het geneesmiddel, influx-transporter inhibitie, efflux transporter overexpressie,...) met toch een minimale weerslag op het metabooloom. Dit toont het belang aan van integratieve studies die het organisme benaderen als een systeem en op alle functionele niveaus (genoom, epigenoom, transcriptoom, proteoom en metabooloom) op zoek gaan naar een verklaring om deze vervolgens samen te leggen. Bovendien kunnen de mechanismen die bij resistente parasieten leiden tot wijzigingen in het metabooloom enkel volledig begrepen worden wanneer naar alle biologische niveaus gekeken wordt. Inderdaad worden er momenteel bij de Onderzoeksgroep Moleculaire Parasitologie (Instituut voor Tropische Geneeskunde) uitgebreide DNA-analysen van al deze resistente stammen uitgevoerd en zal deze uiteindelijk worden vergeleken met deze studie.

Hoewel hier ook het belang van *in vitro* studies werd aangetoond, moeten de experimentele resultaten geverifieerd worden wanneer natuurlijk resistente stammen opduiken (nu is er enkel SB- en AMB-resistentie in het veld). Tevens moet de aanwezigheid van de mechanismen in amastigoten worden onderzocht, omdat dit het stadium is dat *in vivo* aan het geneesmiddel wordt blootgesteld.

Tot slot is het belangrijk om opvolgexperimenten te voorzien die de gegeneerde hypothesen kunnen testen. Ten eerste zal worden nagegaan of GPC(O-14:0/1) een contaminant was in de batch MIL door LC-MS analyse van enkel het geneesmiddel. Als dit niet zo blijkt te zijn wordt voorgesteld om het experiment deels (MIL-resistente stammen) opnieuw te doen met <sup>14</sup>C-miltefosine om uit te zoeken of het GPC(O-14:0/1) een onrechtstreekse metaboliet is van MIL. Op dezelfde manier zou <sup>15</sup>N-proline of een knock-out van zijn transporter kunnen uitsluiten of de verhoogde prolineniveaus een gevolg zijn van de toegenomen opname of productie van proline. Ook enzymen die de reacties van de metabolieten katalyseren kunnen het doel zijn van opvolgstudies. Metabolomics gekoppeld aan conditionele knock-out of overexpressiestudies van bepaalde genen en zelfs enzymen kunnen dus een krachtig hulpmiddel zijn om de functie van een bepaalde reactie in een biologisch systeem te begrijpen (Banaszynski et al., 2006; Schrader et al., 2010).

## 6 Referenties

### Literatuur

- Abu-Dayyeh, I., Shio, M. T., Sato, S., Akira, S., Cousineau, B., & Olivier, M. (2008). Leishmania-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(12), e305.
- Acestor, N., Masina, S., Ives, A., Walker, J., Saravia, N. G., & Fasel, N. (2006). Resistance to oxidative stress is associated with metastasis in mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, 194(8), 1160–7.
- Adaui, V., Castillo, D., Zimic, M., Gutierrez, A., Decuypere, S., Vanaerschot, M., ... Dujardin, J.-C. (2011). Comparative gene expression analysis throughout the life cycle of *Leishmania braziliensis*: diversity of expression profiles among clinical isolates. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(5), e1021.
- Aït-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B., Oury, B., & Sereno, D. (2011). Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitology research*, 109(5), 1225–32.
- Annesley, T. M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 49(7), 1041–4.
- Banaszynski, L. a, Chen, L.-C., Maynard-Smith, L. a, Ooi, a G. L., & Wandless, T. J. (2006). A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell*, 126(5), 995–1004.
- Bañuls, A.-L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology*, 64, 1–109.
- Barrett, M. P. (1997). The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitology today*, 13(1), 11–16.
- Bates, P. a, & Rogers, M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Current molecular medicine*, 4(6), 601–9.
- Berg, M., Vanaerschot, M., Jankevics, A., Cuypers, B., Breitling, R., & Dujardin, J. C. (2013). LC-MS metabolomics from study design to data-analysis—using a versatile pathogen as a test case. *Computational and structural biotechnology journal*, 4(5), 1–8.
- Berg, M., Vanaerschot, M., Jankevics, A., Cuypers, B., Maes, I., Khanal, B., Rijal, S., Opperdoes, F., Breitling, R., & Dujardin, J. C.. Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure. *Onder review*.
- Berger, B., Dai, W., Wang, H., Stark, R., & Cerami, A. (1996). Aromatic amino acid transamination and methionine recycling in trypanosomatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(April), 4126–4130.
- Bhattarai, N. R., Van der Auwera, G., Rijal, S., Picado, A., Speybroeck, N., Khanal, B., ... Dujardin, J. C. (2010). Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. *Emerging infectious diseases*, 16(2), 231–7.

- Bogdan, C., & Röllinghoff, M. (1998). The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*, 28(1), 121–34.
- Bordier, C., Etges, R. J., Ward, J., Turner, M. J., & Cardoso de Almeida, M. L. (1986). Leishmania and Trypanosoma surface glycoproteins have a common glycopospholipid membrane anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(16), 5988–91.
- Bouvier, J., Bordier, C., Vogel, H., & Reichelt, R. (1989). Characterization of the promastigote surface protease of Leishmania as a membrane-bound zinc endopeptidase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37, 235–245.
- Bringaud, F., Barrett, M., & Zilberstein, D. (2012). Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Frontiers in bioscience*, 17, 349–374.
- Brittingham, a, & Mosser, D. M. (1996). Exploitation of the complement system by Leishmania promastigotes. *Parasitology today (Personal ed.)*, 12(11), 444–7.
- Carneiro, M., Moreno, E. C., Gonçalves, A. V., Lambertucci, J. R., & Antunes, C. M. F. (2011). Visceral Leishmaniasis: Challenges in identifying subclinical Leishmania infection. *Drug Development Research*, 72(6), 442–450.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Retrieved from <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
- Chandra, D., & Naik, S. (2008). Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clinical and experimental immunology*, 154(2), 224–34.
- Chang, K. P. (1979). Leishmania donovani: promastigote--macrophage surface interactions in vitro. *Experimental parasitology*, 48(2), 175–89.
- Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., & Boelaert, M. (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 333(7571), 723.
- Chatelain, R., Varkila, K., & Coffman, R. (1992). IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice. *J. Immunol.*, 148(4), 1182–1187.
- Chawla, B., Jhingran, A., Panigrahi, A., Stuart, K. D., & Madhubala, R. (2011). Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin - susceptible -resistant Leishmania donovani. *PloS one*, 6(10), e26660.
- Chunge, C. N., Owate, J., Pamba, H. O., & Donno, L. (1990). Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), 221–5.
- Creek, Darren, Jankevics, A., Merlo, M. E., Vries, M., Vonk, R. J., Takano, E., & Breitling, R. (2012). IDEOM: An excel interface for analysis of LC-MS based metabolomics data. *Bioinformatics*, 28(7), 1048–1049.

- Creek, DJ, Jankevics, A., Breitling, R., Watson, D. G., Barrett, M. P., & Burgess, K. E. V. (2011). Toward Global Metabolomics Analysis with Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Improved Metabolite Identification by Retention Time Prediction. *Analytical Chemistry*, 83, 8703–8710.
- Croft, S. L., Seifert, K., & Duchêne, M. (2003). Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Molecular and biochemical parasitology*, 126(2), 165–72.
- Croft, S. L., Sundar, S., & Fairlamb, A. H. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. *Society*, 19(1), 111–126.
- Cunningham, M. L., & Fairlamb, a H. (1995). Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *European journal of biochemistry / FEBS*, 230(2), 460–8.
- Davis, B. D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological reviews*, 51(3), 341–50.
- Decuypere, S., Rijal, S., Yardley, V., Doncker, S. De, Laurent, T., & Khanal, B. (2005). Gene Expression Analysis of the Mechanism of Natural Sb ( V ) Resistance in *Leishmania donovani* Isolates from Nepal. *Society*, 49(11), 4616–4621.
- Denton, H., McGregor, J. C., & Coombs, G. H. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *The Biochemical journal*, 381(Pt 2), 405–12.
- Descoteaux, A., & Turco, S. J. (2002). Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 4(9), 975–81.
- Desjardins, B. M., & Descoteaux, A. (1997). Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. *Cell*, 185(12), 2613 – 2620.
- Dey, S., Ouellette, M., Lightbody, J., Papadopoulou, B., & Rosen, B. P. (1996). An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5), 2192–7.
- Dorlo, T. P. C., Van Thiel, P. P. a M., Huitema, A. D. R., Keizer, R. J., De Vries, H. J. C., Beijnen, J. H., & De Vries, P. J. (2008). Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(8), 2855–60.
- Ferreira, C. D. S., Martins, P. S., Demicheli, C., Brochu, C., Ouellette, M., & Frézard, F. (2003). Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 16(3), 441–6.
- Forget, G., Gregory, D. J., Whitcombe, L. a, & Olivier, M. (2006). Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infection and immunity*, 74(11), 6272–9.
- García-Hernández, R., Manzano, J. I., Castanys, S., & Gamarro, F. (2012). *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(12), e1974.

- Ghalib, H. W., Piuvezam, M. R., Skeiky, Y. a, Siddig, M., Hashim, F. a, el-Hassan, a M., ... Reed, S. G. (1993). Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *The Journal of clinical investigation*, 92(1), 324–9.
- Gomez, M., Contreras, I., Hallé, M., Tremblay, M. L., McMaster, R. W., & Olivier, M. (2009). *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Science signaling*, 2(September), 1–12.
- Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, M., ... Mukhopadhyay, R. (2004). Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *The Journal of biological chemistry*, 279(30), 31010–7.
- Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., ... Bryceson, A. D. M. (2002). Personal view Visceral leishmaniasis Visceral leishmaniasis : current status of control , diagnosis , and treatment , and a proposed research and development agenda Personal view. *The Lancet*, 2(August), 494–501.
- Haase, R., Wieder, T., Geilen, C., & Reutter, W. (1991). hexadecylphosphocholine inhibits biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells analogue. *Lipids*, 288(1), 129–132.
- Handman, E., & Goding, J. W. (1985). The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *The EMBO journal*, 4(2), 329–36. Hartsel, S., & Bolard, J. (1996). Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends in pharmacological sciences*, 17(12), 445–9.
- Herman, J., Gallalee, J., & Best, J. (1987). Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid  $\beta$ -oxidation in *leishmania mexicana* amastigotes. *Biochemical pharmacology*, 36(2), 197–201.
- Inbar, E., Schlisselberg, D., Suter Grottemeyer, M., Rentsch, D., & Zilberstein, D. (2013). A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses. *The Biochemical journal*, 449(2), 555–66.
- Jankevics, A., Merlo, M. E., De Vries, M., Vonk, R. J., Takano, E., & Breitling, R. (2012). Separating the wheat from the chaff: a prioritisation pipeline for the analysis of metabolomics datasets. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, 8(Suppl 1), 29–36.
- Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M. P., & Madhubala, R. (2009). Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology*, 164(2), 111–117.
- Khalil, E. a G., Zijlstra, E. E., Kager, P. a, & El Hassan, a M. (2002). Epidemiology and clinical manifestations of *Leishmania donovani* infection in two villages in an endemic area in eastern Sudan. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 7(1), 35–44.
- Kompare, M., & Rizzo, W. B. (2008). Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Seminars in pediatric neurology*, 15(3), 140–9.
- Krauth-Siegel, R. L., & Comini, M. a. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(11), 1236–48.
- Lamy-Freund, M. T., Ferreira, V. F., & Schreier, S. (1989). Polydispersity of aggregates formed by the polyene antibiotic amphotericin B and deoxycholate. A spin label study. *Biochimica et biophysica acta*, 981(2), 207–12.

- Légaré, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y. D., Rosen, B. P., Haimeur, a, ... Ouellette, M. (2001). The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *The Journal of biological chemistry*, 276(28), 26301–7.
- Lodge, R., Diallo, T. O., & Descoteaux, A. (2006). Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cellular microbiology*, 8(12), 1922–31.
- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., & Opperdoes, F. R. (2000). Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in Leishmania. *Molecular and biochemical parasitology*, 111(1), 1–14.
- Maarouf, M., Adeline, M., Solignac, M., Vautrin, D., & Robert-Gero, M. (1998). Development and characterization of paromomycin-resistant Leishmania donovani promastigotes. *Parasite*, 5, 167–173.
- Maarouf, M., Lawrence, F., & Brown, S. (1997). Biochemical alterations in paromomycin-treated Leishmania donovani promastigotes. *Parasitology research*, 198–202.
- Mallia, A. K., Frovenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Olson, B. J., Klenk, D. C., & Company, P. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid ', 85, 76–85.
- Mandal, G., Wyllie, S., Singh, N., Sundar, S., Fairlamb, a H., & Chatterjee, M. (2007). Increased levels of thiols protect antimony unresponsive Leishmania donovani field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. *Parasitology*, 134(Pt 12), 1679–87.
- Mandal, S., Maharjan, M., Singh, S., Chatterjee, M., & Madhubala, R. (2010). Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of Leishmania donovani from India. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(3), 496–507.
- Marinho, F. D. A., Gonçalves, K. C. D. S., Oliveira, S. S. De, Oliveira, A.-C. D. S. C. De, Bellio, M., d'Avila-Levy, C. M., ... Branquinha, M. H. (2011). Miltefosine induces programmed cell death in Leishmania amazonensis promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 507–9.
- Matysik, J., Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants, 82(5).
- Mbongo, N., Loiseau, P., Billion, M. A., & Robert-Gero, M. (1998). Mechanism of Amphotericin B Resistance in Leishmania donovani Promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(2), 352–357.
- McConville, M. J., Turco, S. J., Ferguson, M. a, & Sacks, D. L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of Leishmania major promastigotes to an infectious stage. *The EMBO journal*, 11(10), 3593–600.
- Meheus, F., Balasegaram, M., Olliaro, P., Sundar, S., Rijal, S., Faiz, M. A., & Boelaert, M. (2010). Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(9).
- Melaku, Y., Collin, S. M., Keus, K., Gatluak, F., Ritmeijer, K., & Davidson, R. N. (2007). Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(1), 89–94.

- Mittal, M. K., Rai, S., Ashutosh, Ravinder, Gupta, S., Sundar, S., & Goyal, N. (2007). Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76(4), 681–8.
- Mondal, S., Bhattacharya, P., & Ali, N. (2010). Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(8), 919–44.
- Mosser, D. M., & Brittingham, a. (1997). *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, 115 Suppl, S9–23.
- Mukhopadhyay, R., Mukherjee, S., Mukherjee, B., Naskar, K., Mondal, D., Decuypere, S., ... Roy, S. (2011). Characterisation of antimony-resistant *Leishmania donovani* isolates: biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. *International journal for parasitology*, 41(13-14), 1311–21.
- Murray, H W. (1999). Kala-azar as an AIDS-related opportunistic infection. *AIDS patient care and STDs*, 13(8), 459–65.
- Murray, Henry W, Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366(9496), 1561–77.
- Murray, Henry W, Oca, M. J., Granger, A. M., & Schreiber, R. D. (1989). Requirement for T Cells and Effect of Lymphokines in Successful Chemotherapy for an Intracellular Infection. *Chemotherapy*, 83(April), 1253–1257.
- Nandan, D., & Reiner, N. E. (2005). *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 114(3), 266–77.
- Nandan, D., Tran, T., Trinh, E., Silverman, J. M., & Lopez, M. (2007). Identification of leishmania fructose-1,6-bisphosphate aldolase as a novel activator of host macrophage Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 364(3), 601–7.
- Ostyn, B., Gidwani, K., Khanal, B., Picado, A., Chappuis, F., Singh, S. P., ... Boelaert, M. (2011). Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(10), e1284.
- Ouakad, M., Vanaerschot, M., Rijal, S., Sundar, S., Speybroeck, N., Kestens, L., ... Dujardin, J.-C. (2011). Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitology*, 138(11), 1392–9.
- Paila, Y. D., Saha, B., & Chattopadhyay, A. (2010). Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 399(3), 429–33.
- Paris, C., Loiseau, P. M., & Bories, C. (2004). Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Society*, 48(3), 852–859.
- Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Molecular microbiology*, 53(3), 717–24.

- Pathak, M. K., & Yi, T. (2001). Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(6), 3391–7.
- Pérez-Morga, D., & Englund, P. T. (1993). The structure of replicating kinetoplast DNA networks. *The Journal of cell biology*, 123(5), 1069–79.
- Pérez-Victoria, F. J., Santiago, C., & Gamarro, F. (2003). Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(8), 2397–2403.
- Pérez-Victoria, J. M., Pérez-Victoria, J., Parodi-Talice, A., Jiménez, I. A., Ravelo, A. G., Santiago, C., & Gamarro, F. (2001). Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant Leishmania tropica and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrobial agents*, 45(9), 2468–2474.
- Peters, W. (1981). The treatment of kala-azar--new approaches to an old problem. *The Indian journal of medical research*, 73(Jan), Suppl:1-18.
- Piedrafita, D., Proudfoot, L., Nikolaev, a V, Xu, D., Sands, W., Feng, G. J., ... Liew, F. Y. (1999). Regulation of macrophage IL-12 synthesis by Leishmania phosphoglycans. *European journal of immunology*, 29(1), 235–44.
- Prajapati, V. K., Sharma, S., Rai, M., Ostyn, B., Salotra, P., Vanaerschot, M., ... Sundar, S. (2013). In vitro susceptibility of Leishmania donovani to Miltefosine in Indian Visceral Leishmaniasis. *American journal of tropical medicine & hygiene*, accepted.
- Puentes, S., Sacks, D., & Silva, R. da. (1988). Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*, 167(March).
- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A. H., Das, S., Kumar, S., ... Das, P. (2012). Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(2), 1031–41.
- Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M., & Loiseau, P. M. (2005). Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrobial agents*, 49(7), 2677–2686.
- Rijal, S, Chappuis, F., Singh, R., Bovier, P. a, Acharya, P., Karki, B. M. S., ... Koirala, S. (2003). Treatment of visceral leishmaniasis in south-eastern Nepal: decreasing efficacy of sodium stibogluconate and need for a policy to limit further decline. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 350–4.
- Rijal, Suman, Ostyn, B., & Uranw, S. (2013). Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, re-infection or non-compliance. *Clinical Infectious Diseases, Advance Ac*, 1–26.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R. W., & Zilberstein, D. (2008). Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB journal*, 22(2), 590–602.



- Russell, D., & Wilhelm, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *The journal of immunology*, *136*(7), 2613 – 2620.
- Sacks, D., Pimenta, P., & McConville, M. (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*, *181*(February), 685–697.
- Scheltema, R., Decuyper, S., & Dujardin, J. (2009). Simple data-reduction method for high-resolution LC-MS data in metabolomics. *Bioanalysis*, *1*(9), 1–7.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Shlomai, J. (1991). Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, *245*(1313), 121–6.
- Schrader, E., Wilmington, S., & Matouschek, A. (2010). Making it easier to regulate protein stability. *Chemistry & biology*, *17*(9), 917–918.
- Shakarian, a M., & Dwyer, D. M. (2000). Pathogenic leishmania secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Experimental parasitology*, *94*(4), 238–42.
- Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *The Indian journal of medical research*, *123*(3), 311–30.
- Sundar, S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, *6*(11), 849–54.
- Sundar, S, Chakravarty, J., Agarwal, D., Rai, M., & Murray, H. W. (2010). Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *England Journal of Medicine*, *362*(6), 504–512.
- Sundar, Shyam, Agrawal, N., Arora, R., Agarwal, D., Rai, M., & Chakravarty, J. (2009). Short-course paromomycin treatment of visceral leishmaniasis in India: 14-day vs 21-day treatment. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *49*(6), 914–8.
- Sundar, Shyam, Jha, T., & Thakur, C. (2007). Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The new England Journal of Medicine*, *356*(25), 2571–2581.
- Sundar, Shyam, More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., ... Murray, H. W. (2000). Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *31*(4), 1104–7.
- Sundar, Shyam, Singh, A., Rai, M., Prajapati, V. K., Singh, A. K., Ostyn, B., ... Chakravarty, J. (2012). Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *55*(4), 543–50.
- Sundar, Shyam, Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., ... Modabber, F. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*, *377*(9764), 477–86.

- T'Kindt, R., Jankevics, A., Scheltema, R. a, Zheng, L., Watson, D. G., Dujardin, J.-C., ... Decuypere, S. (2010). Towards an unbiased metabolic profiling of protozoan parasites: optimisation of a Leishmania sampling protocol for HILIC-orbitrap analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(5), 2059–69.
- Teklemariam, S., Hiwot, a G., Frommel, D., Miko, T. L., Ganlov, G., & Bryceson, a. (1994). Aminosidine and its combination with sodium stibogluconate in the treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(3), 334–9.
- Thakur, C. P., Kanyok, T. P., Pandey, a K., Sinha, G. P., Zaniewski, a E., Houlihan, H. H., & Olliaro, P. (2000). A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(4), 429–31.
- Uranw, S., Ostyn, B., Rijal, A., Devkota, S., Khanal, B., Menten, J., ... Rijal, S. (2011). Post-kala-azar dermal leishmaniasis in Nepal: a retrospective cohort study (2000-2010). *PLoS neglected tropical diseases*, 5(12), e1433.
- Van Griensven, J., & Boelaert, M. (2011). Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet*, 377(9764), 443–4.
- Vanaerschot, M., De Doncker, S., Rijal, S., Maes, L., Dujardin, J.-C., & Decuypere, S. (2011). Antimonial resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased in vivo parasite burden. *PloS one*, 6(8), e23120.
- Vega, N., Allison, K., Khalil, A., & Collins, J. (2012). Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature chemical biology*, 8(5), 431–433.
- WHO. (2010). *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases*. World Health Organisation.
- Wilson, M. E., Young, B. M., Davidson, B. L., Mente, K. a, & McGowan, S. E. (1998). The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(11), 6148–55.
- Wyllie, S., Cunningham, M. L., & Fairlamb, A. H. (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of biological chemistry*, 279(38), 39925–32.
- Yan, S., Li, F., Ding, K., & Sun, H. (2003). Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 8(6), 689–97.
- Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., Rosen, B. P., & Mukhopadhyay, R. (2004). *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *The Journal of biological chemistry*, 279(36), 37445–51.
- Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., & Hassan, I. M. El. (2003). Review Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet*, 3(February), 87–98.

Zilberstein, D., & Gepstein, a. (1993). Regulation of L-proline transport in *Leishmania donovani* by extracellular pH. *Molecular and biochemical parasitology*, 61(2), 197–205.

#### Handleidingen technische materiaal

1. Thermo Scientific. Orbitrap Technology – Principle of Operation. Beschikbaar op:[http://planetorbitrap.com/pdf/88415\\_PO30208E\\_12\\_09.pdf](http://planetorbitrap.com/pdf/88415_PO30208E_12_09.pdf).
2. Thermo Scientific. Datasheet Exactive. Beschikbaar op:<http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet/techresource?storeId=11152&langId=-1&taxonomy=4&resourceId=93804&contentType=Datasheets&productId=11962084#>.
3. Thermo Scientific (2008). Users Guide HESI-II Probe. Beschikbaar op:[http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File\\_50898.pdf](http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_50898.pdf).

#### Websites

Bioenn tool. Beschikbaar op: <http://www.cmbi.ru.nl/cdd/bioenn/>

Chemspider. Beschikbaar op: <http://www.chemspider.com>.

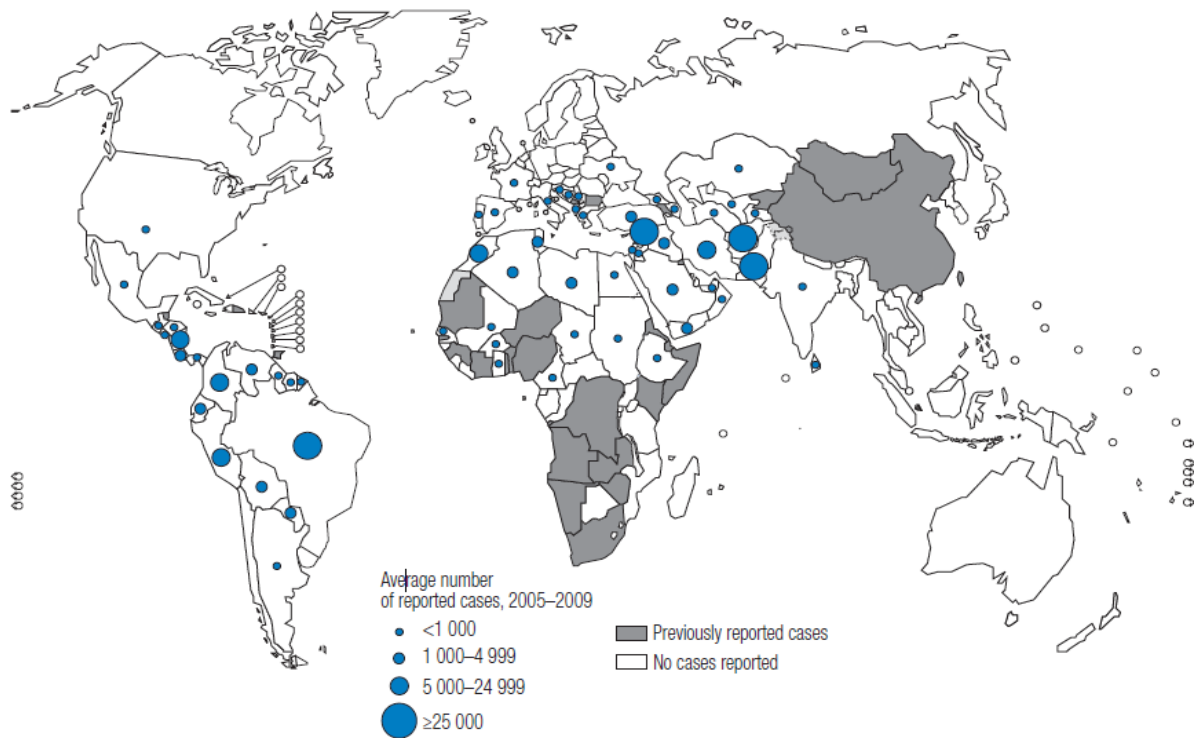
Lipidmaps database. Beschikbaar op: <http://www.lipidmaps.org/>

## 7 Bijlagen

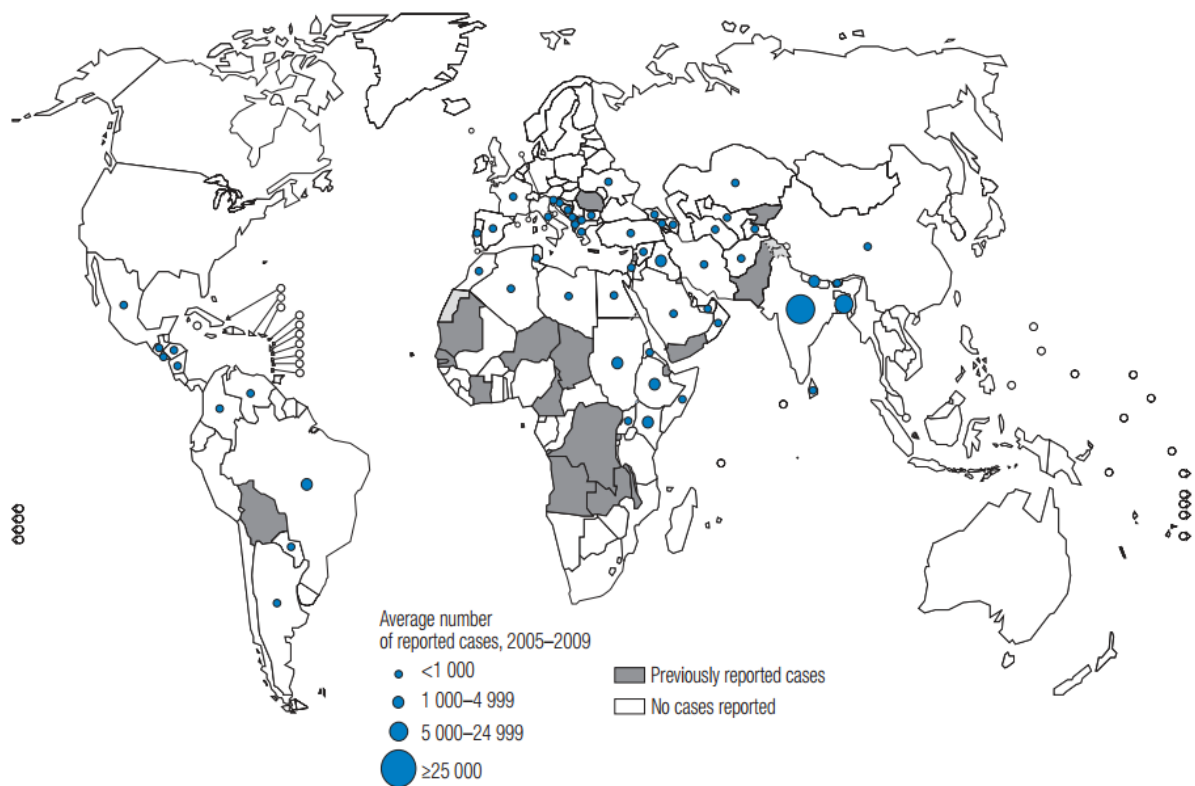
### Overzicht:

- Figuren
  - B1-B2: Distributie cutane en viscerale leishmaniasis
  - B3: Taxonomie
  - B4-B14 : TIC-spectra
  - B15 : Proteïne-inhoud
  - B16 : Totale metabolietintensiteiten
  - B17 : Metacyclogenese
  - B18-B27 : Pathways gerelateerd aan oxidatieve stress in *Leishmania*
- Tabellen
  - B1: EC50-waarden en resistentie-indices
  - B2: LC-MS staalvolgordelijst
  - B3: FI volledige dataset
  - B4: FI vetzuren
  - B5: FI carbohydraten en conjugaten
  - B6: PC2 top 20 factor loadings
  - B7: PC3 top 20 factor loadings
  - B8: FI metabolieten die een hoge correlatie met SB vertonen
  - B9: FI metabolieten die een hoge correlatie met PMM vertonen
  - B10: FI metabolieten van de trypanothion productie-pathway
  - B11: FI aromatische aminozuren

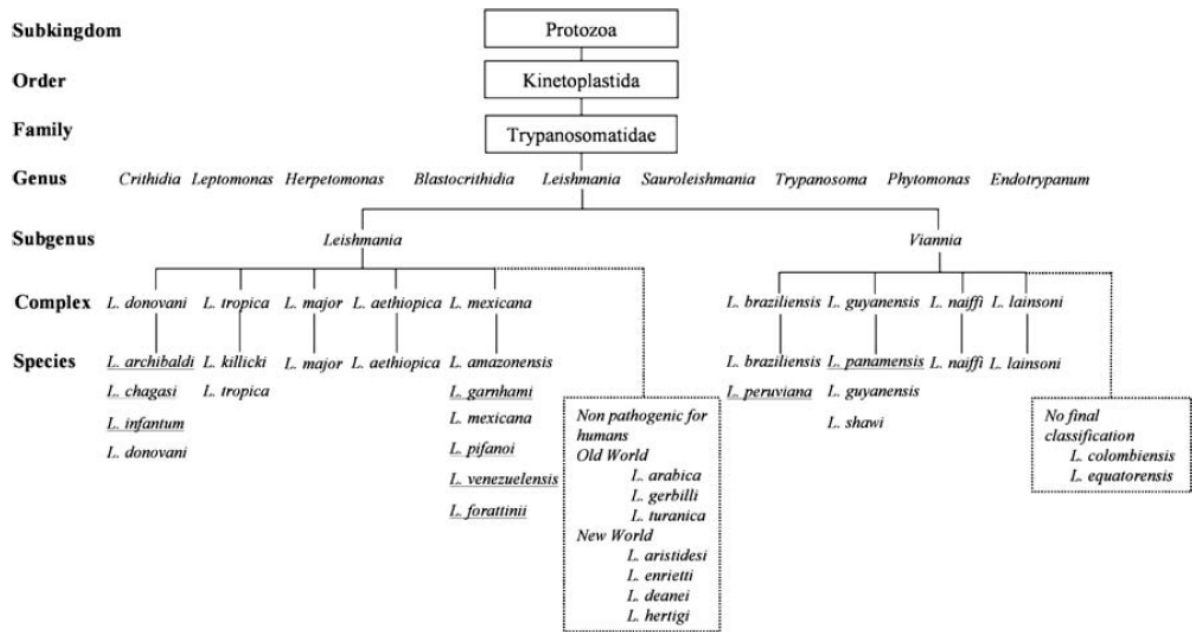
## 8.1 Figuren



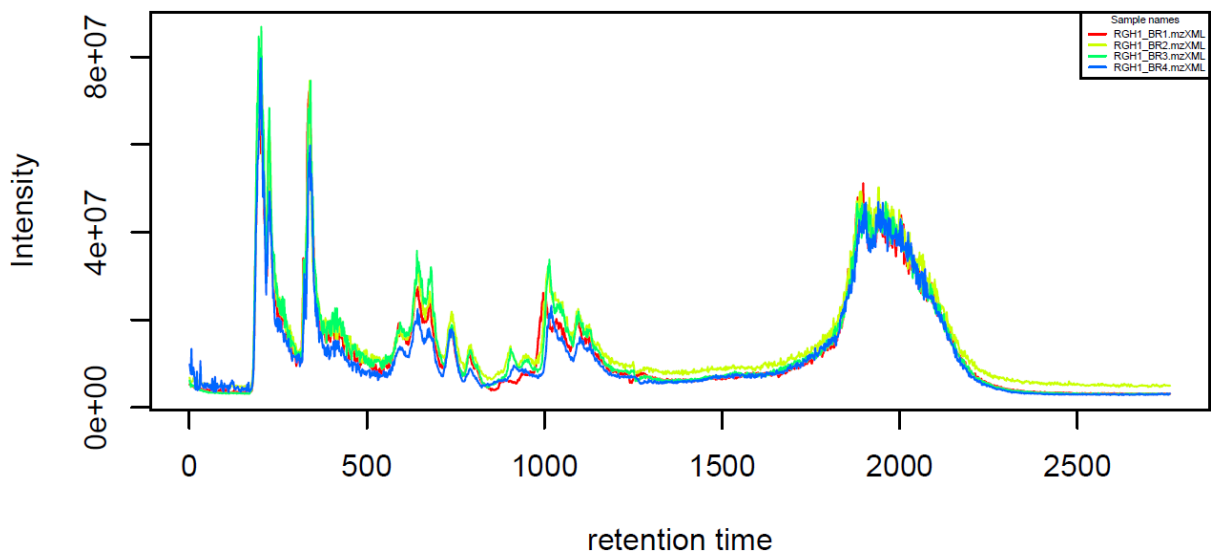
**Figuur B1:** Distributie van cutane leishmaniasis in 2009 (WHO).



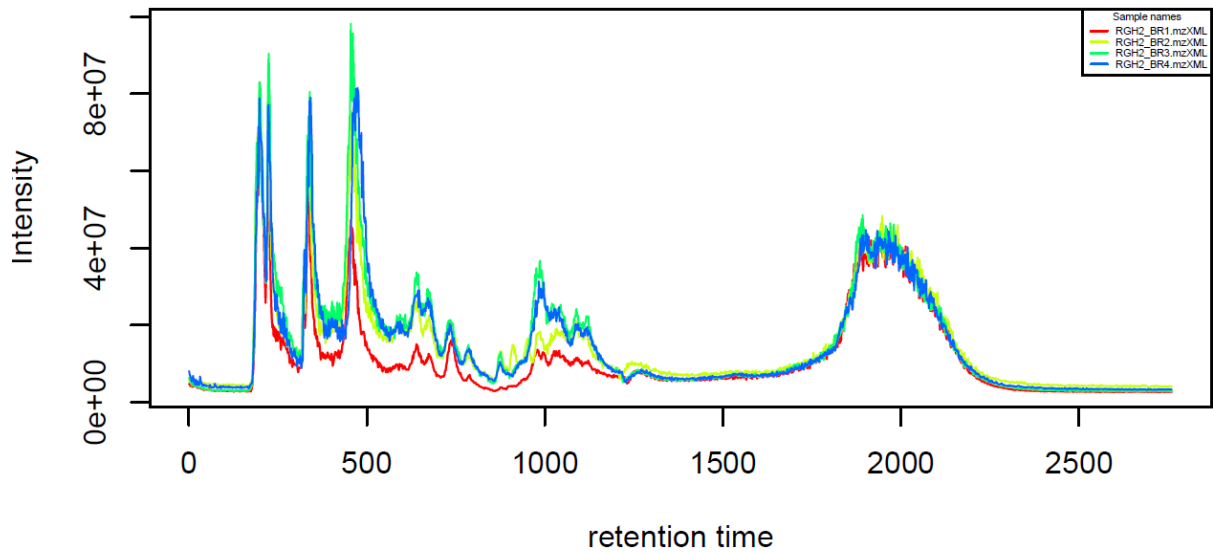
**Figuur B2:** Distributie van viscerale leishmaniasis in 2009 (WHO).



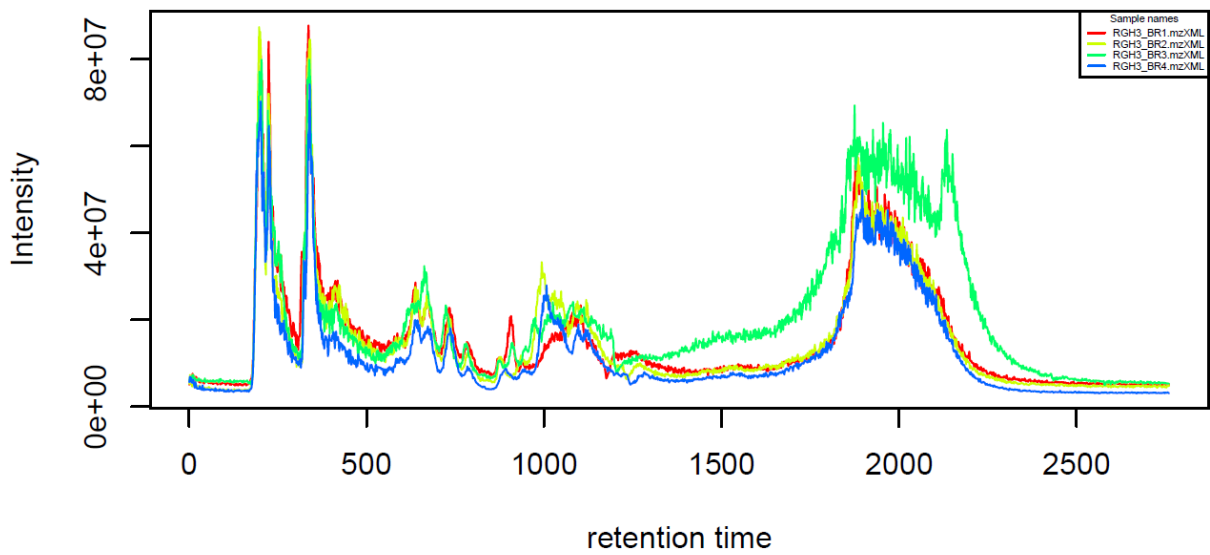
Figuur B3: Taxonomie van *Leishmania* (Uit Bañuls et al.,2007).



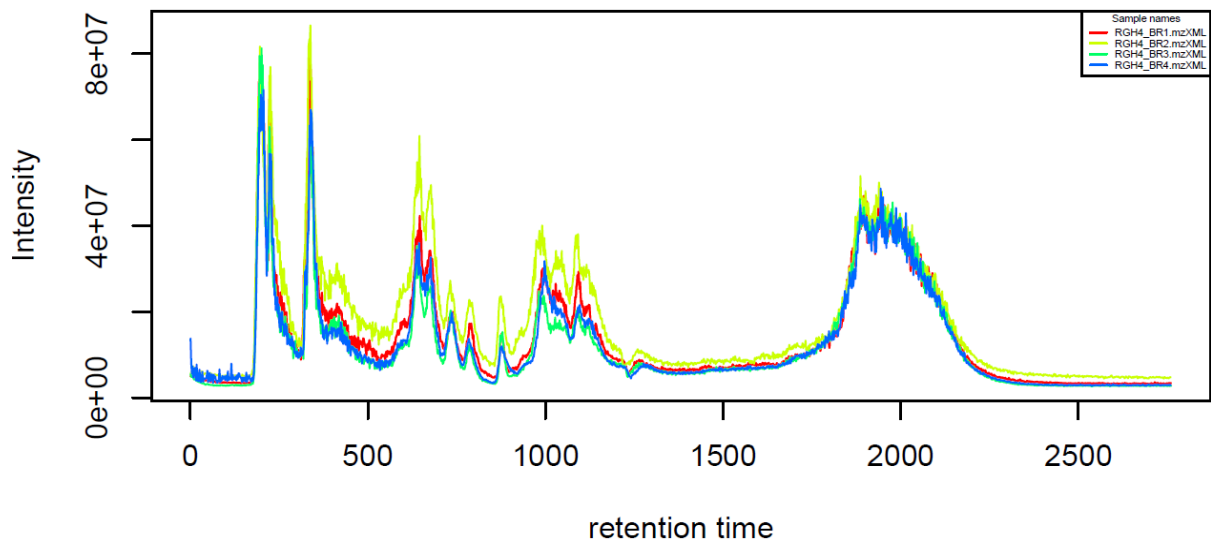
Figuur B4: Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van AMB-R.



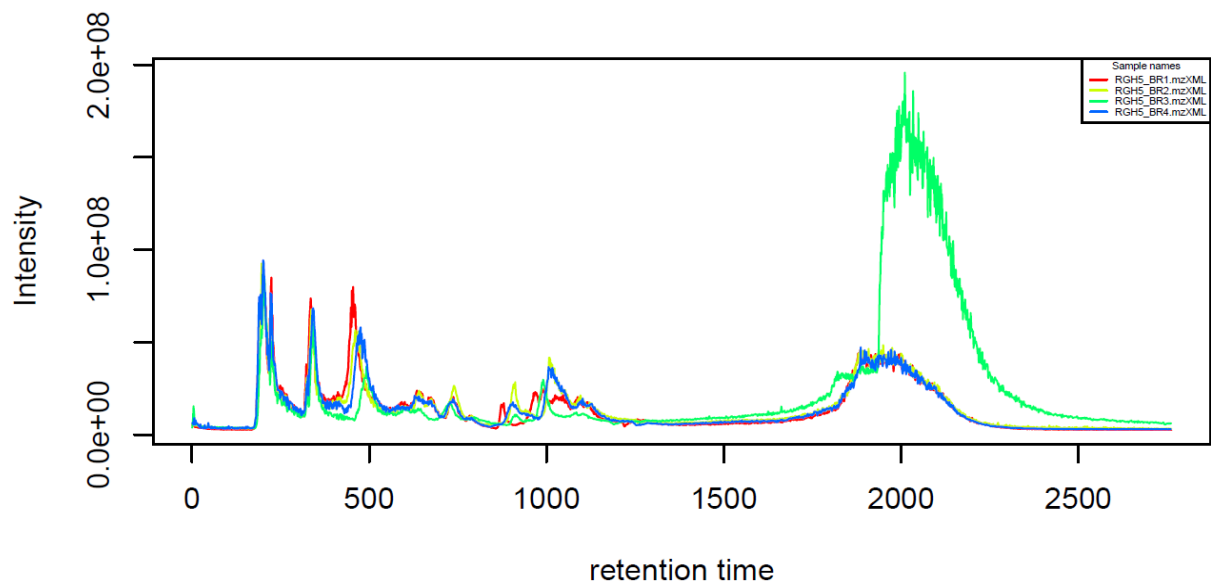
**Figuur B5:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van MIL-R.



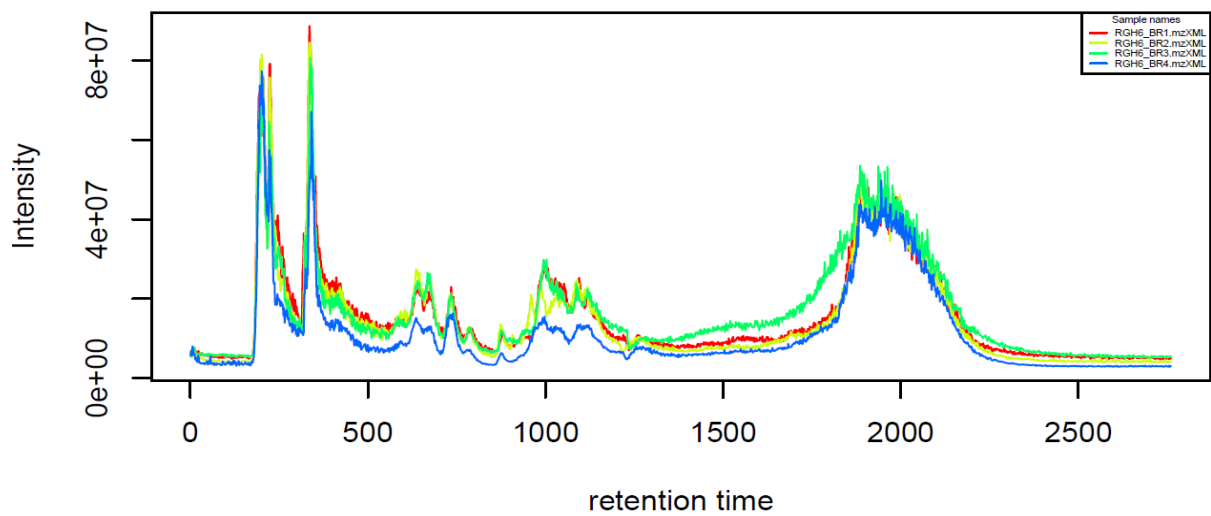
**Figuur B6:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van PMM-R.



**Figuur B7:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van SB-R.

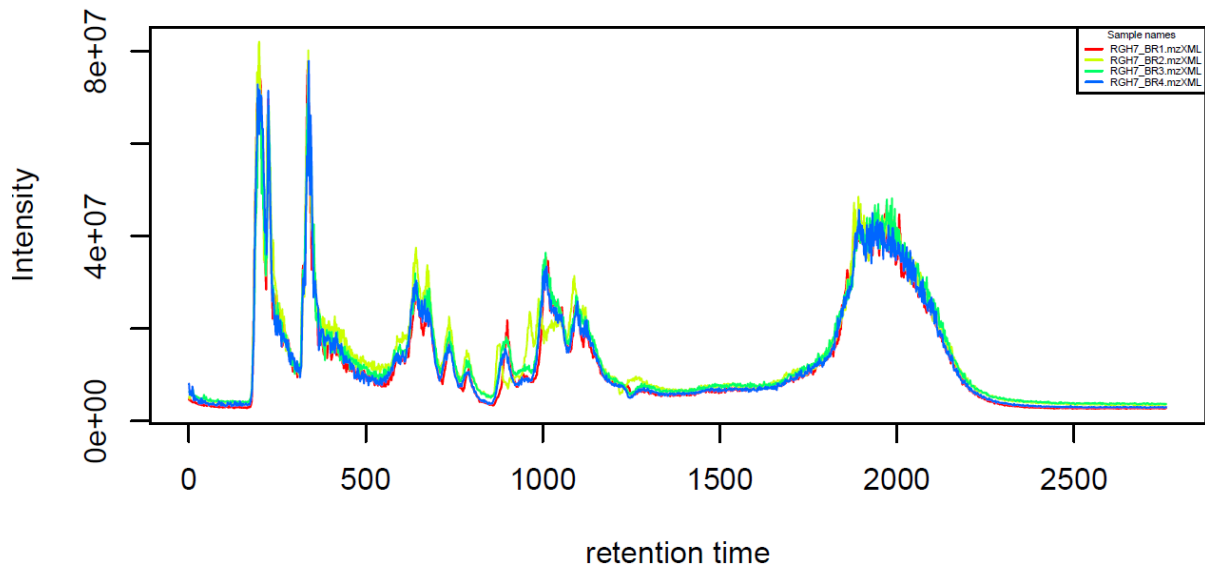


**Figuur B8:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van AMB-MIL-R.

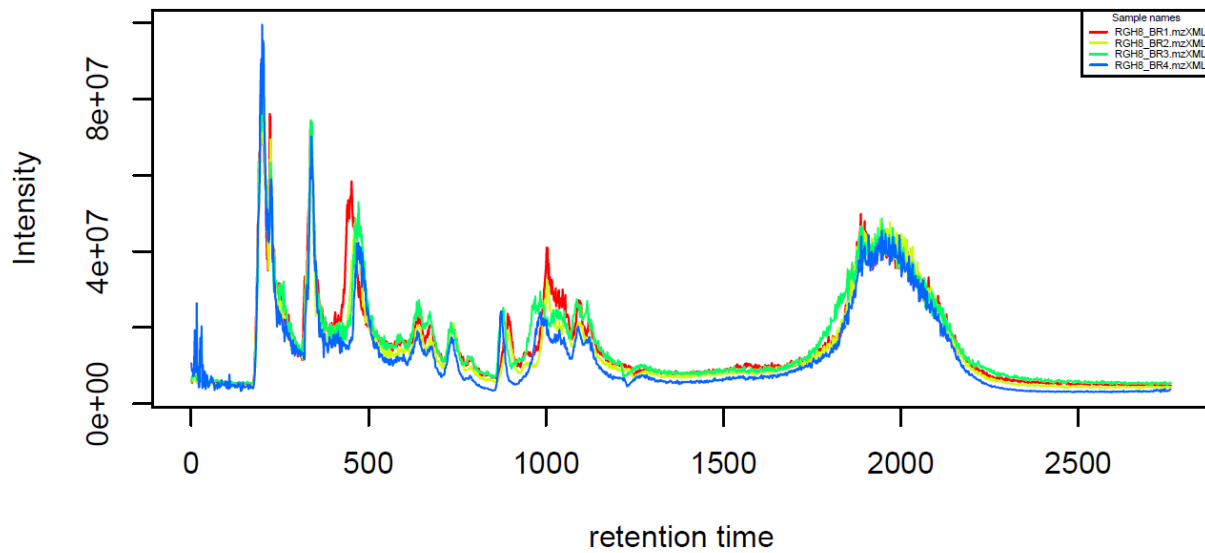


**Figuur B9:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van AMB-PMM-R.

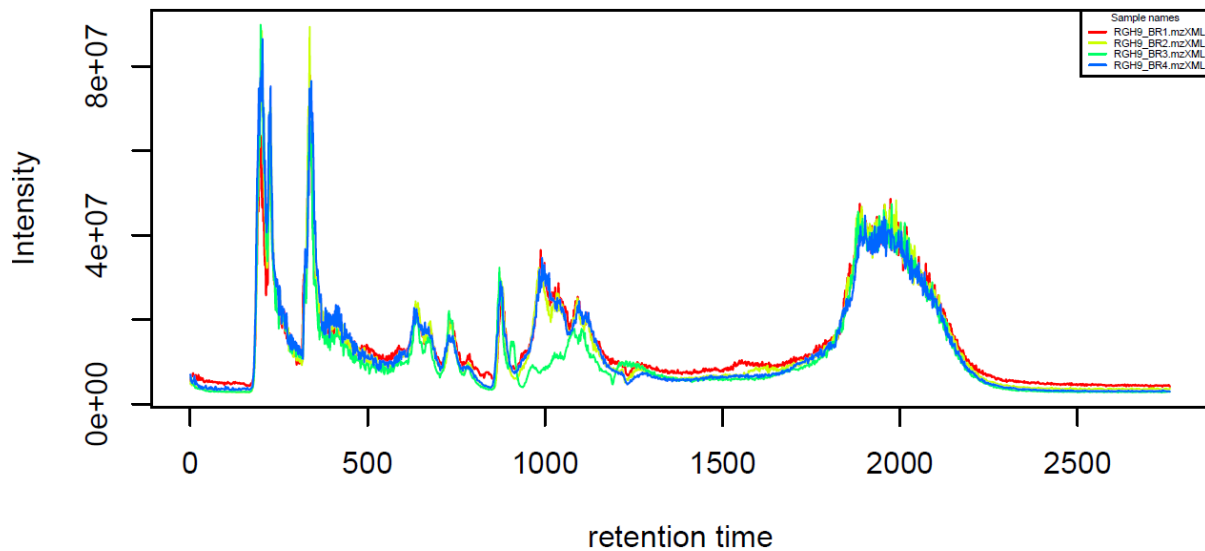




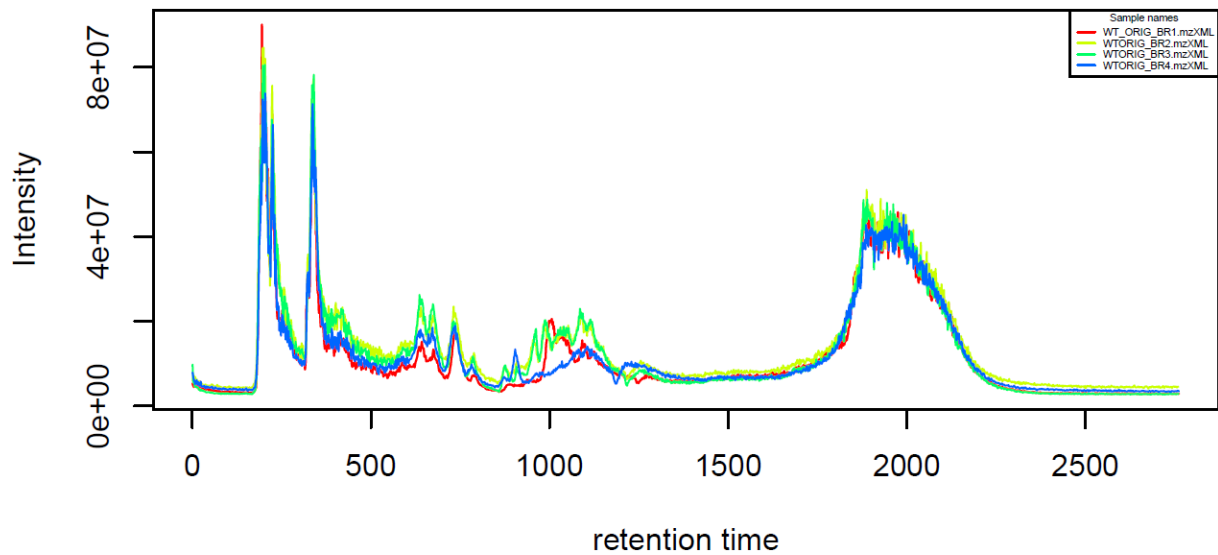
**Figuur B10:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van AMB-SB-R.



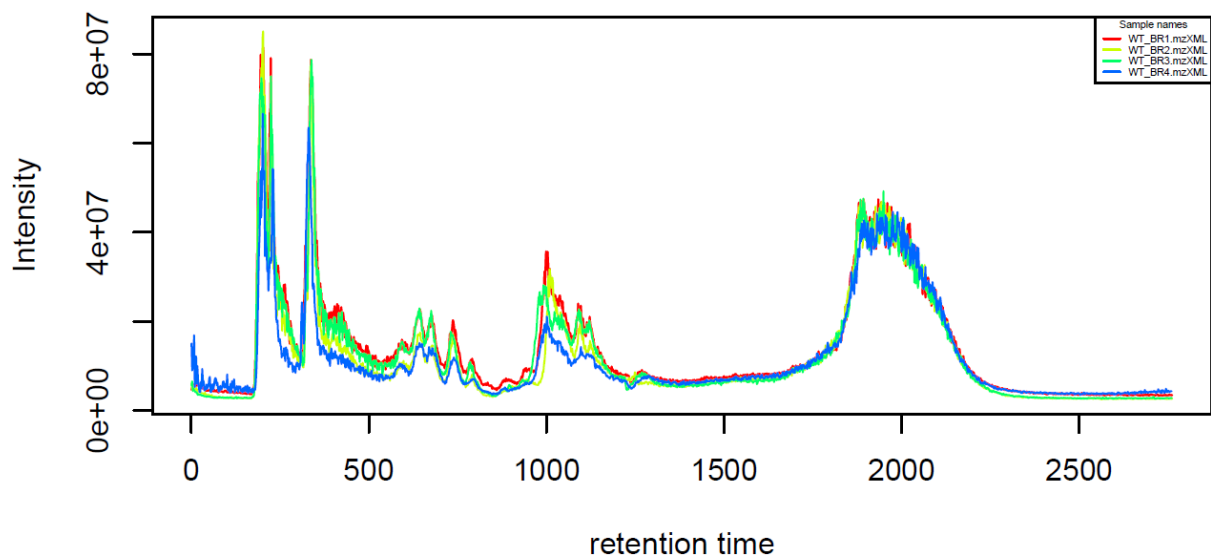
**Figuur B11:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van MIL-PMM-R.



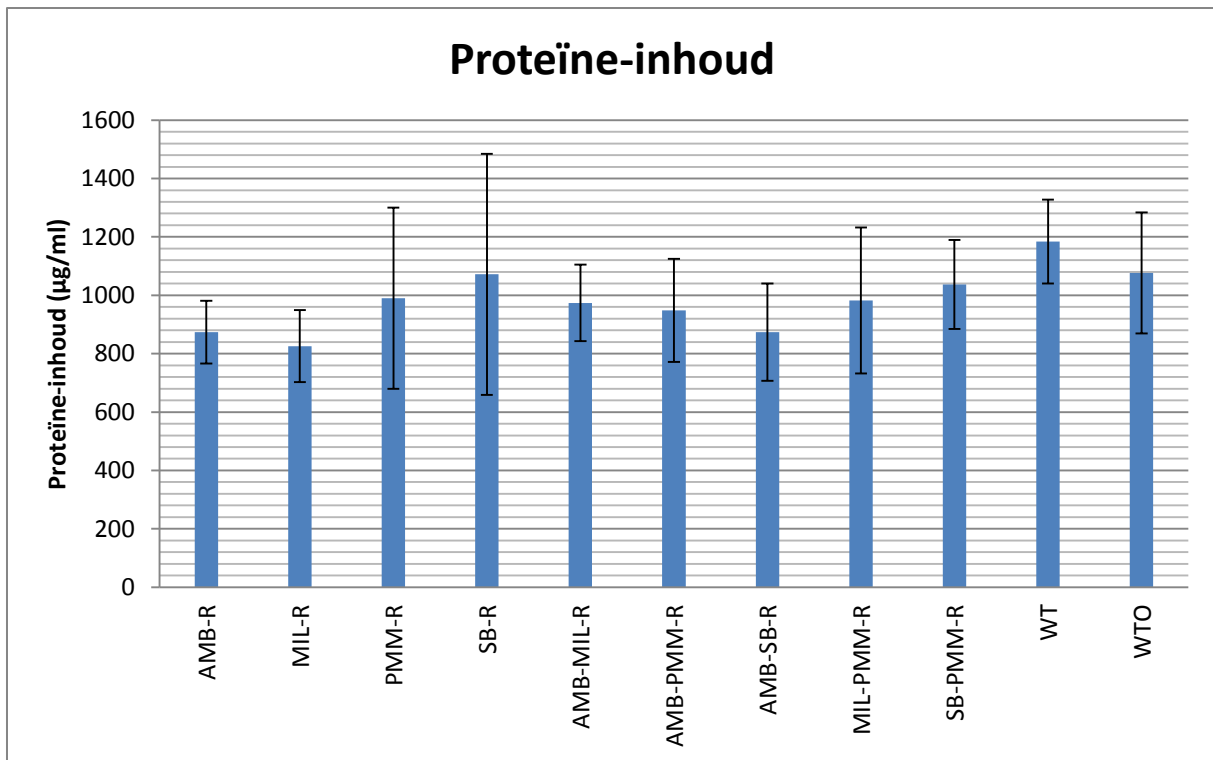
**Figuur B12:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van SB-PMM-R



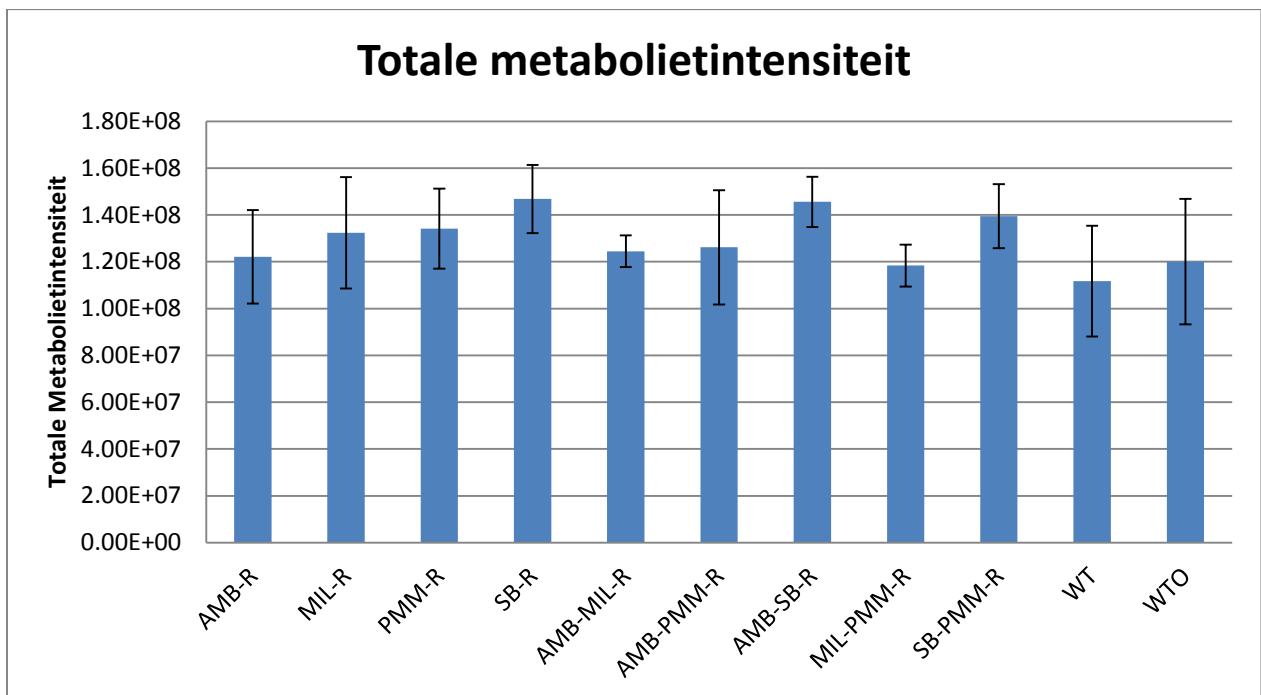
**Figuur B13:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van WTO.



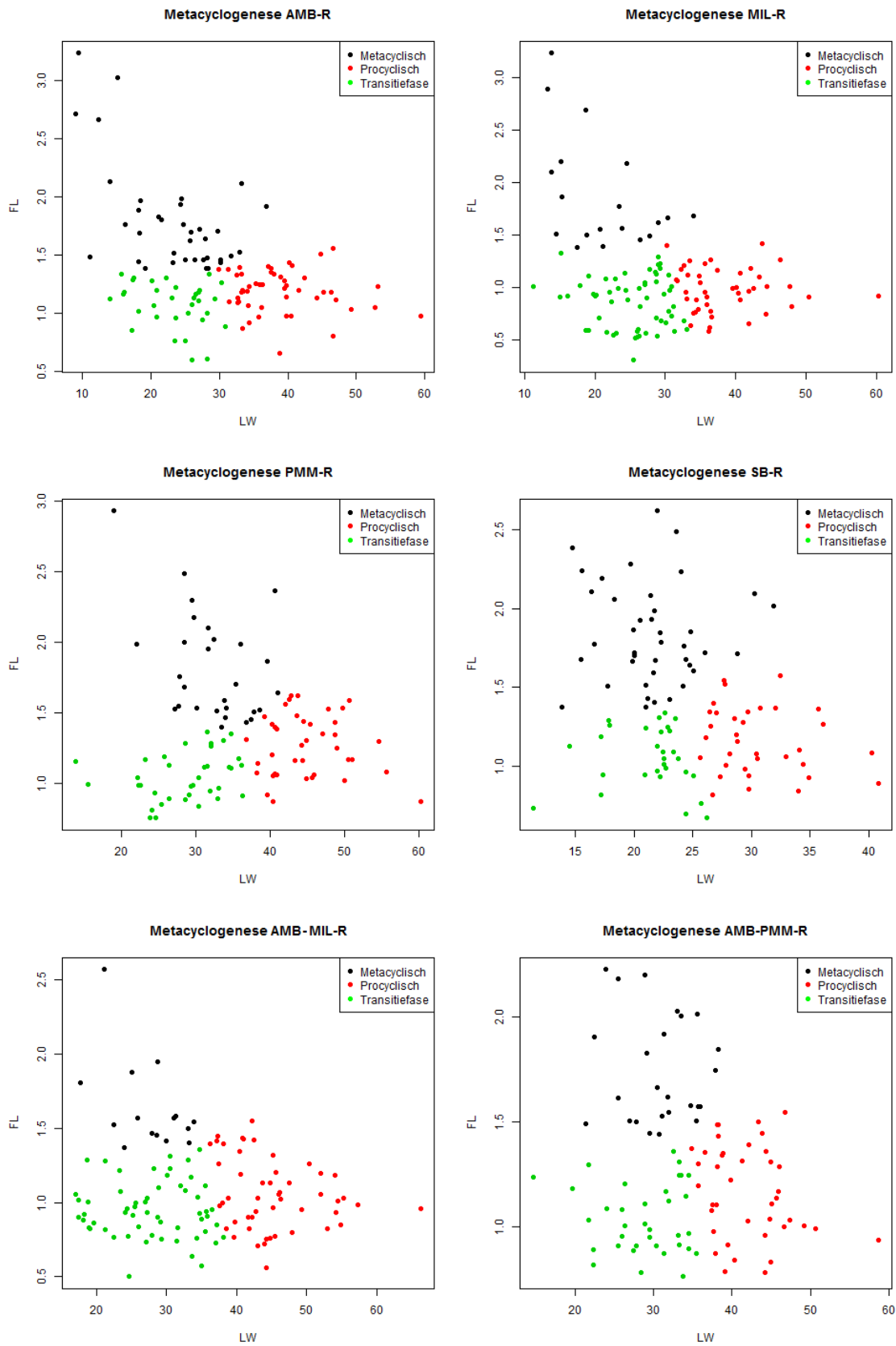
**Figuur B14:** Total ion count (TIC) spectrum van de 4 biologische replicaten van WT.



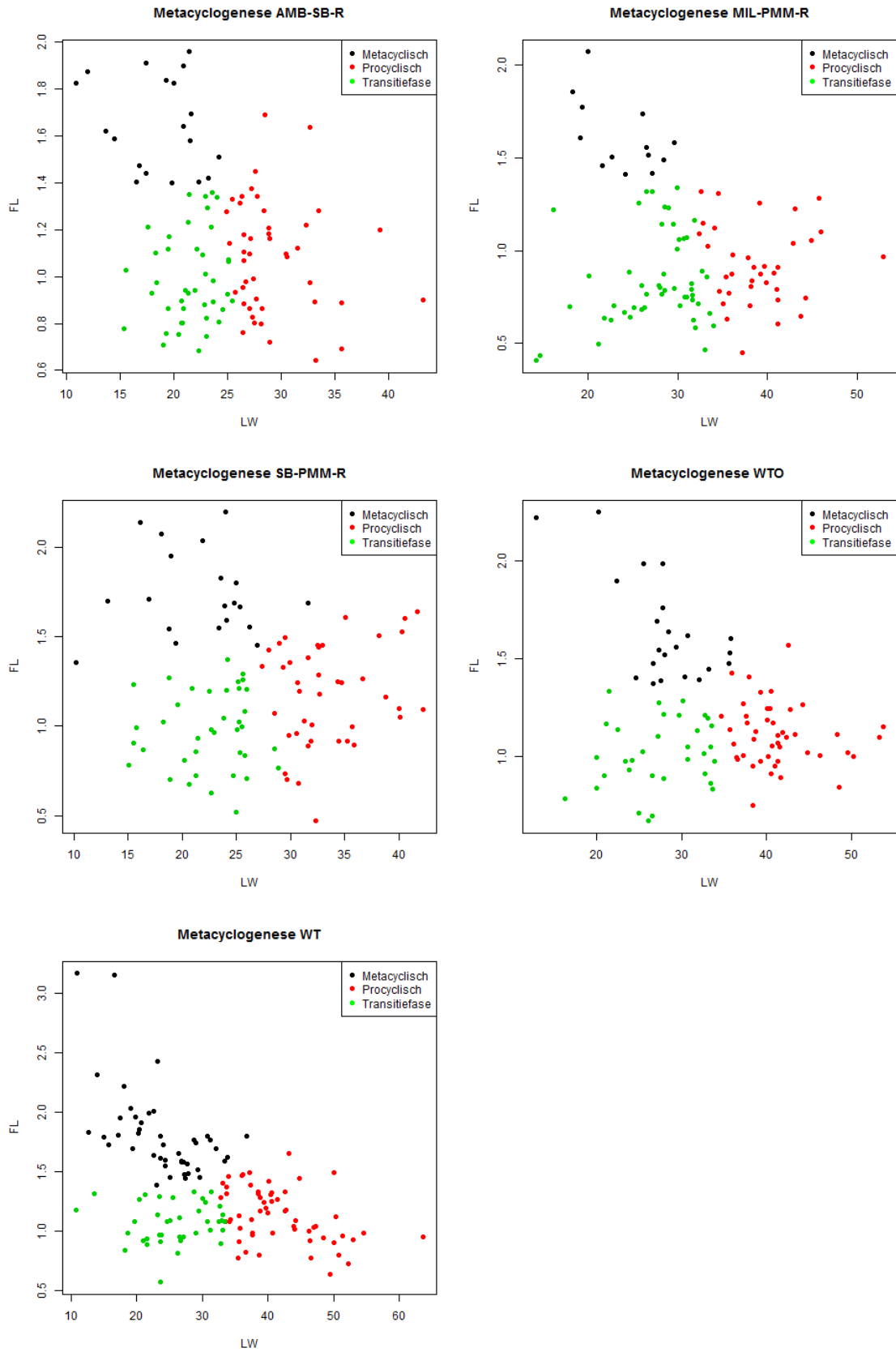
**Figuur B15:** De gemiddelde proteïne-inhoud van de verschillende stammen. De balken geven de standaarddeviaties weer.



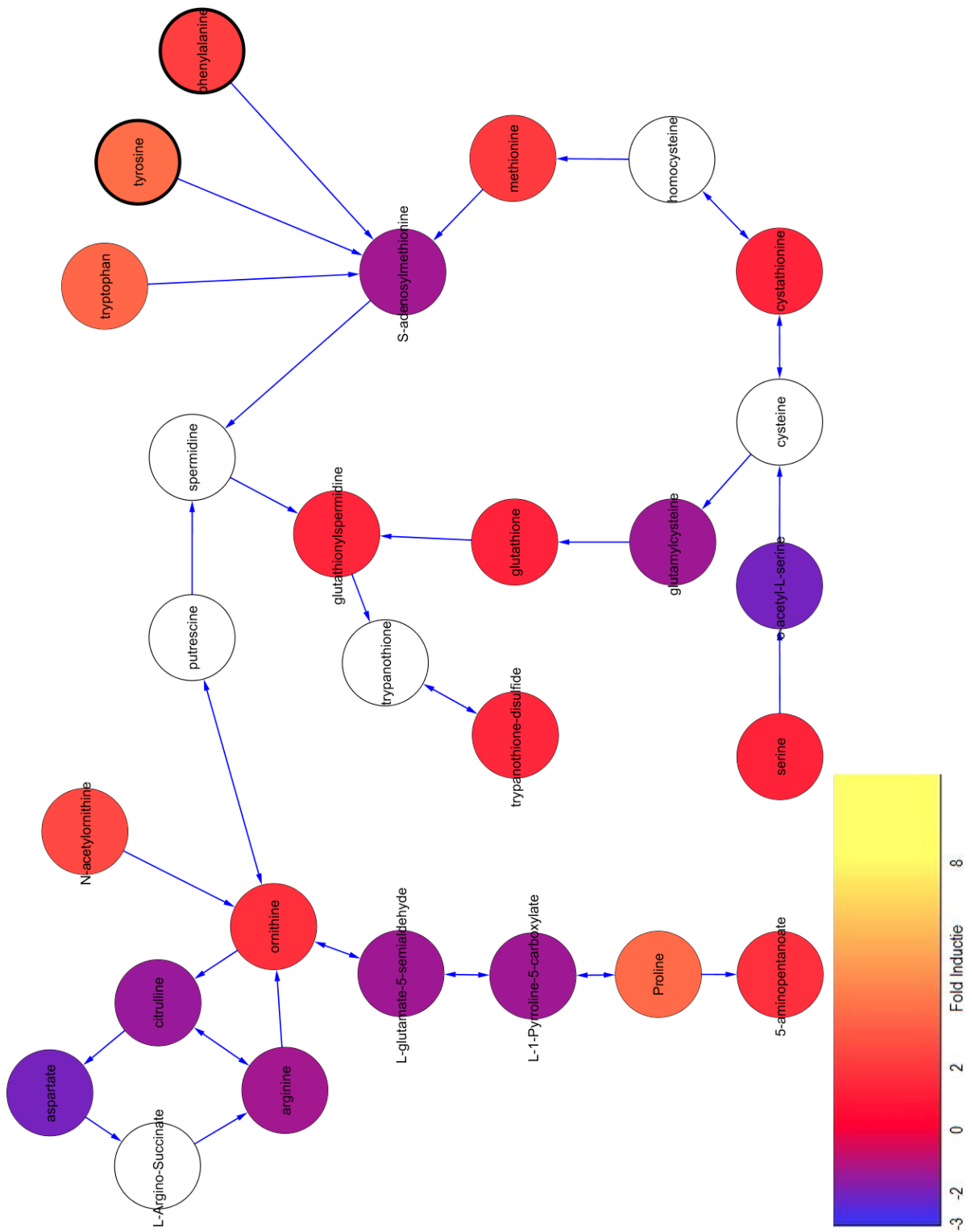
**Figuur B16:** De gemiddelde metabolietintensiteit van de verschillende stammen. De balken geven de standaarddeviaties weer.



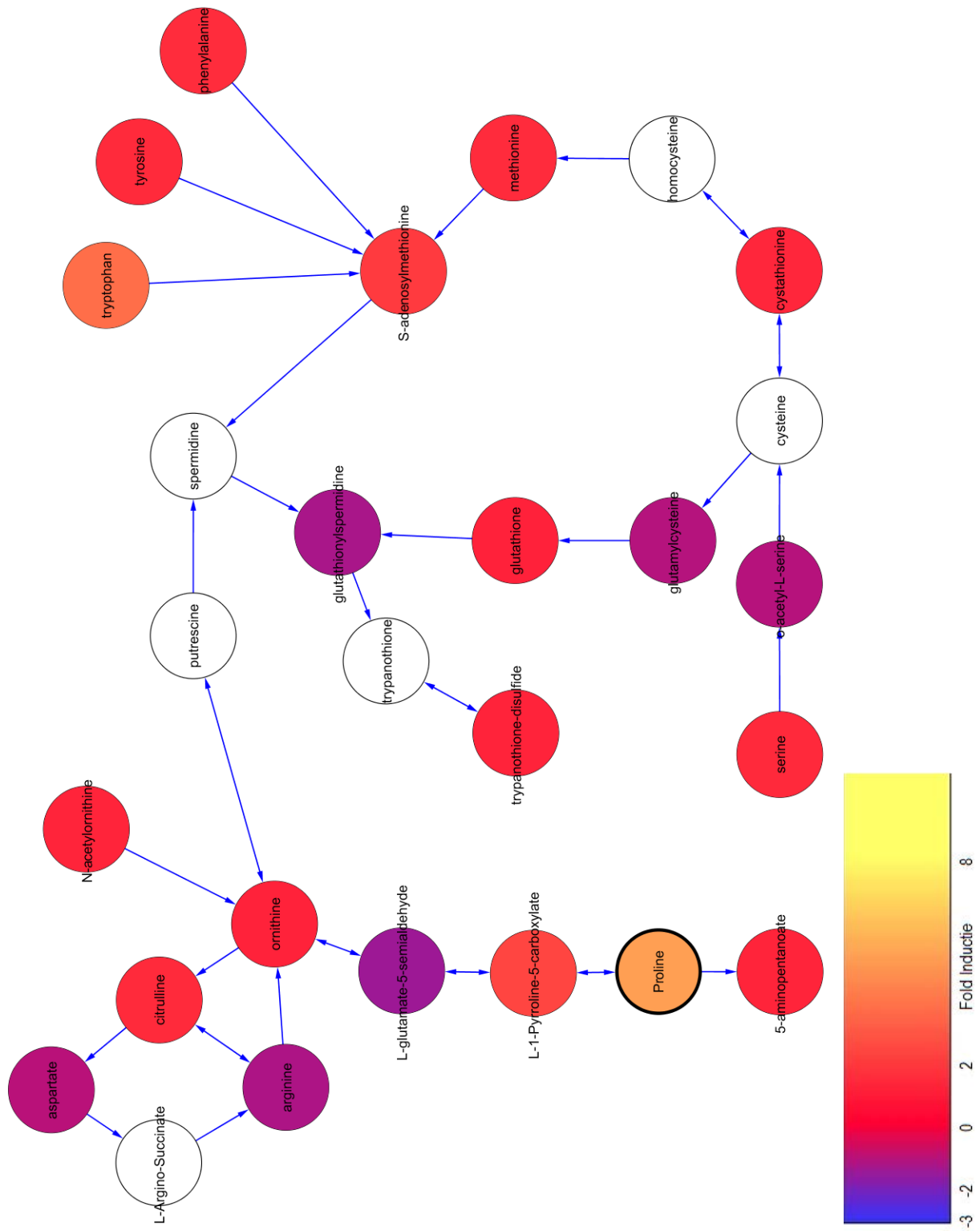
**Figuur B17:** Metacyclo-genese in de verschillende resistente stammen (deel 1). LW=parasietoppervlakte, FL=flagellengte/parasietlengte.



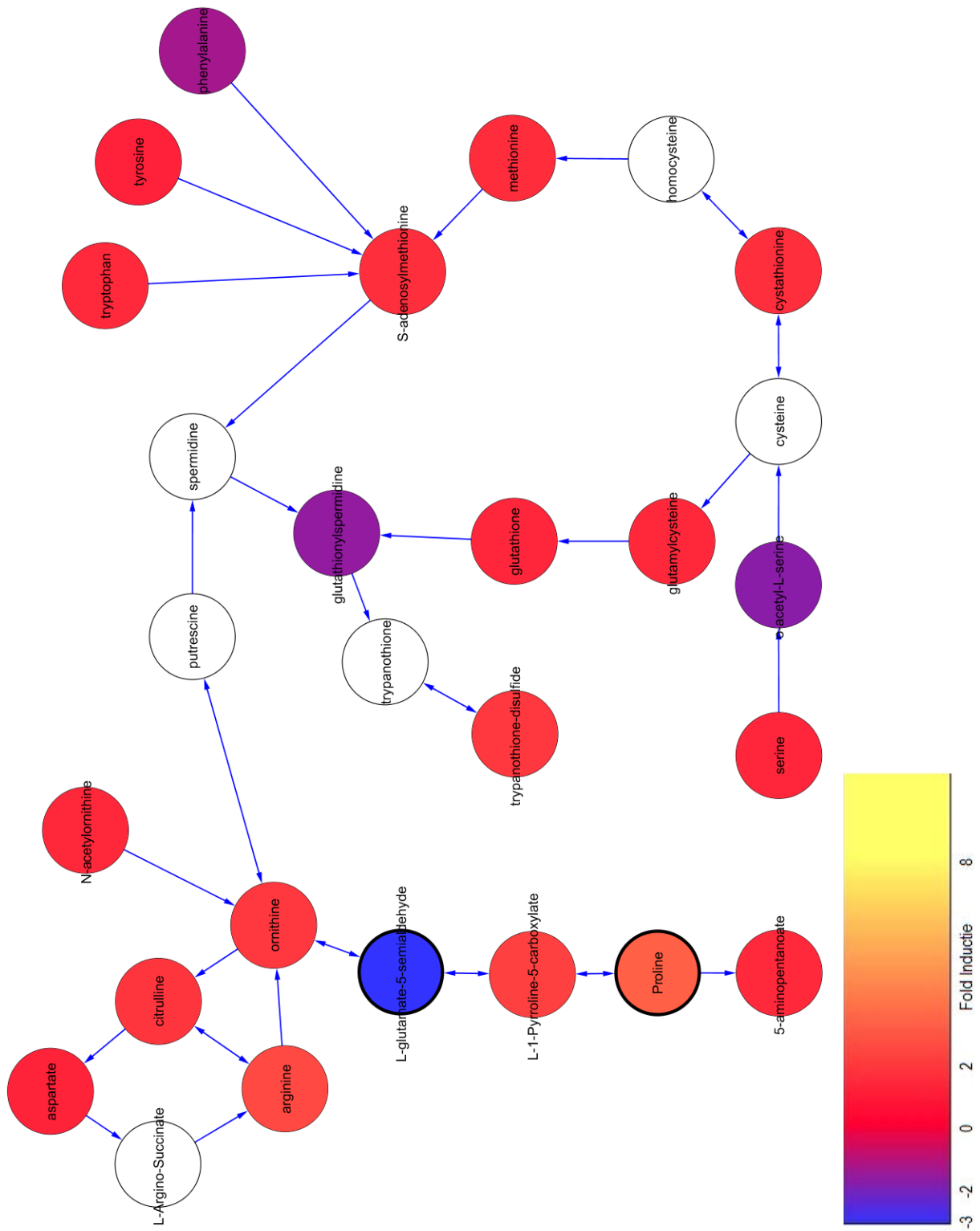
**Figuur B17:** Metacyclogenese in de verschillende resistente stammen (deel 2). LW=parasietoppervlakte, FL=flagellengte/parasietlengte.



**Figuur B18:** De fold-inducties van AMB-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.

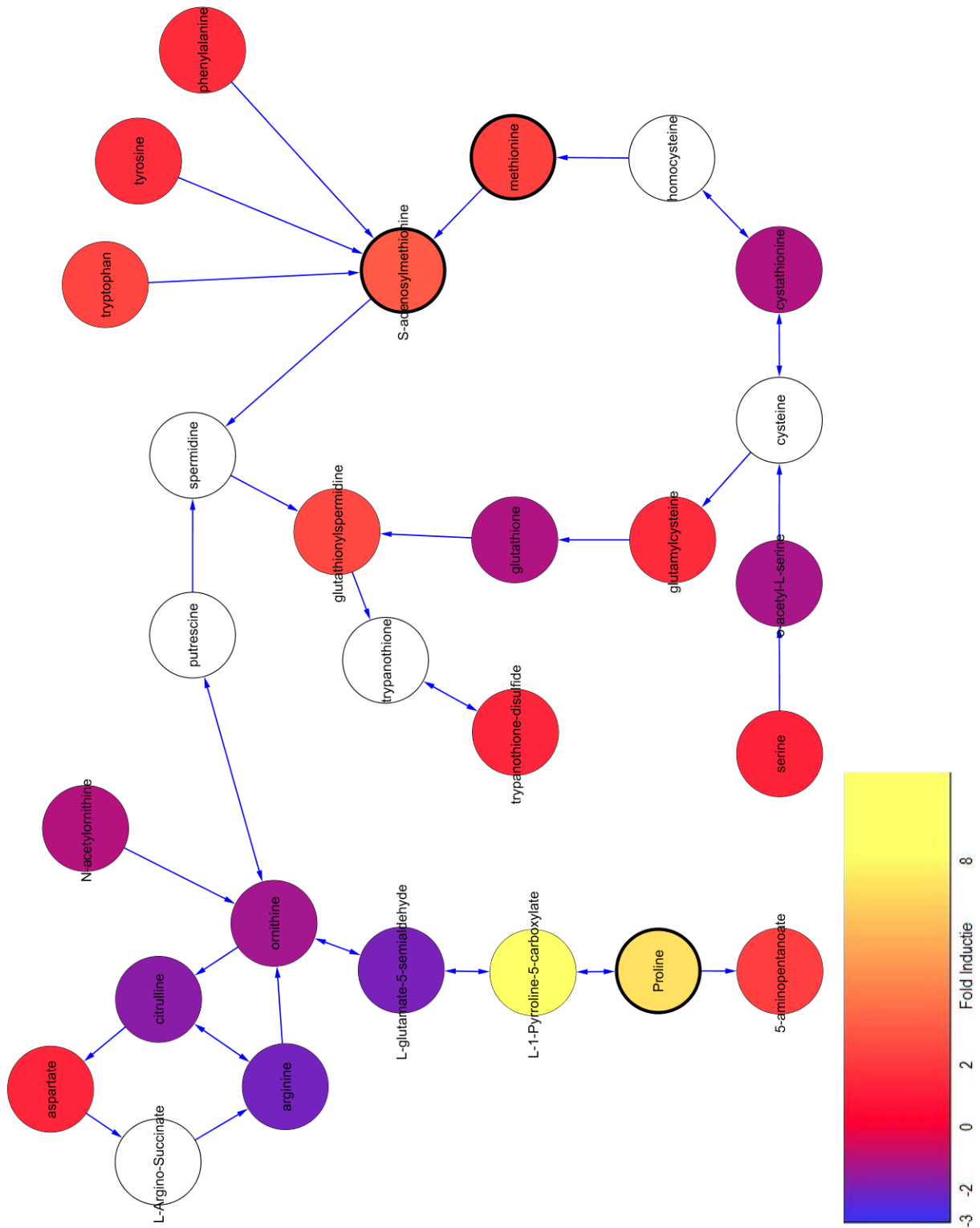


**Figuur B19:** De fold-inducties van MIL-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.

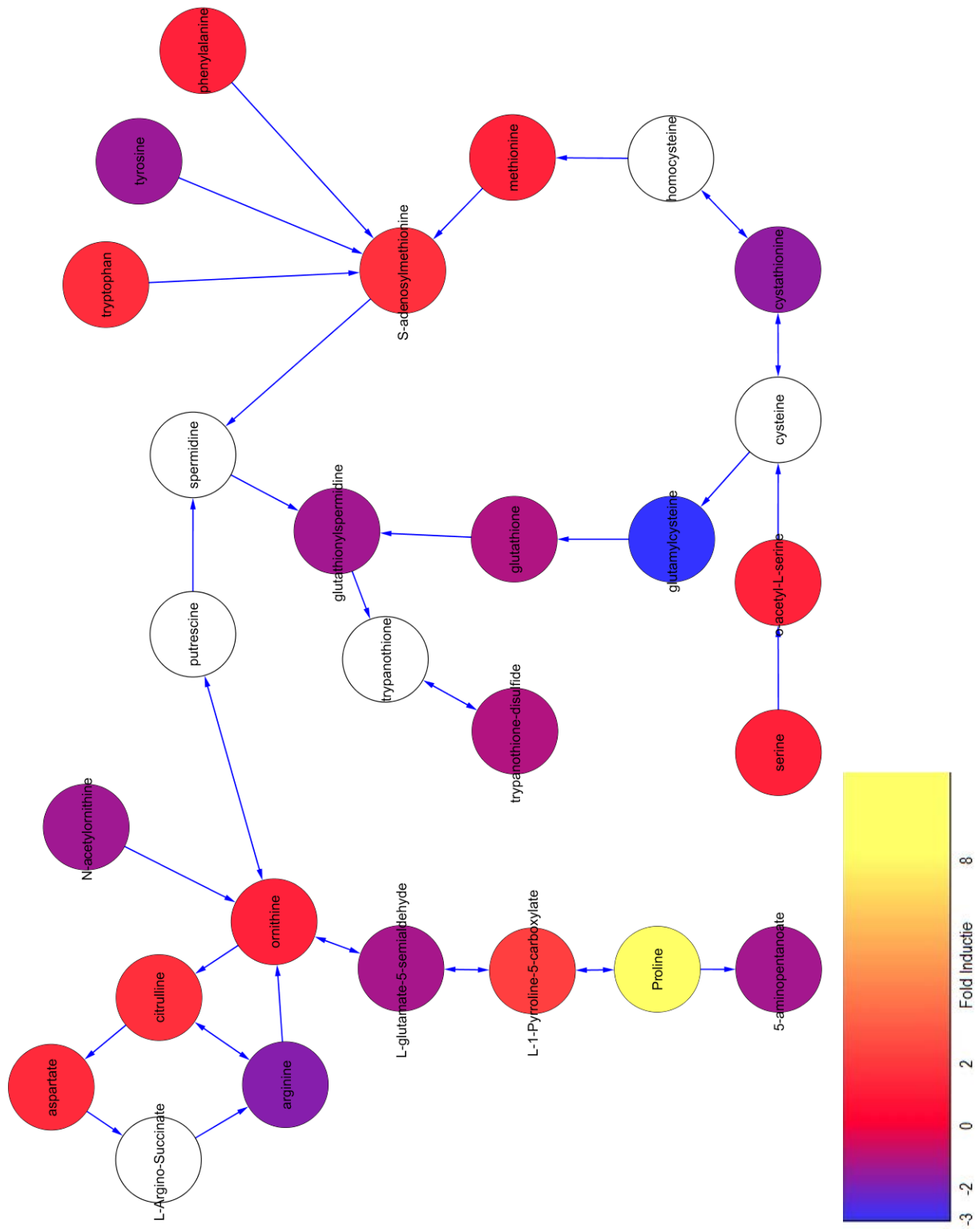


**Figuur B20:** De fold-inducties van PMM-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.

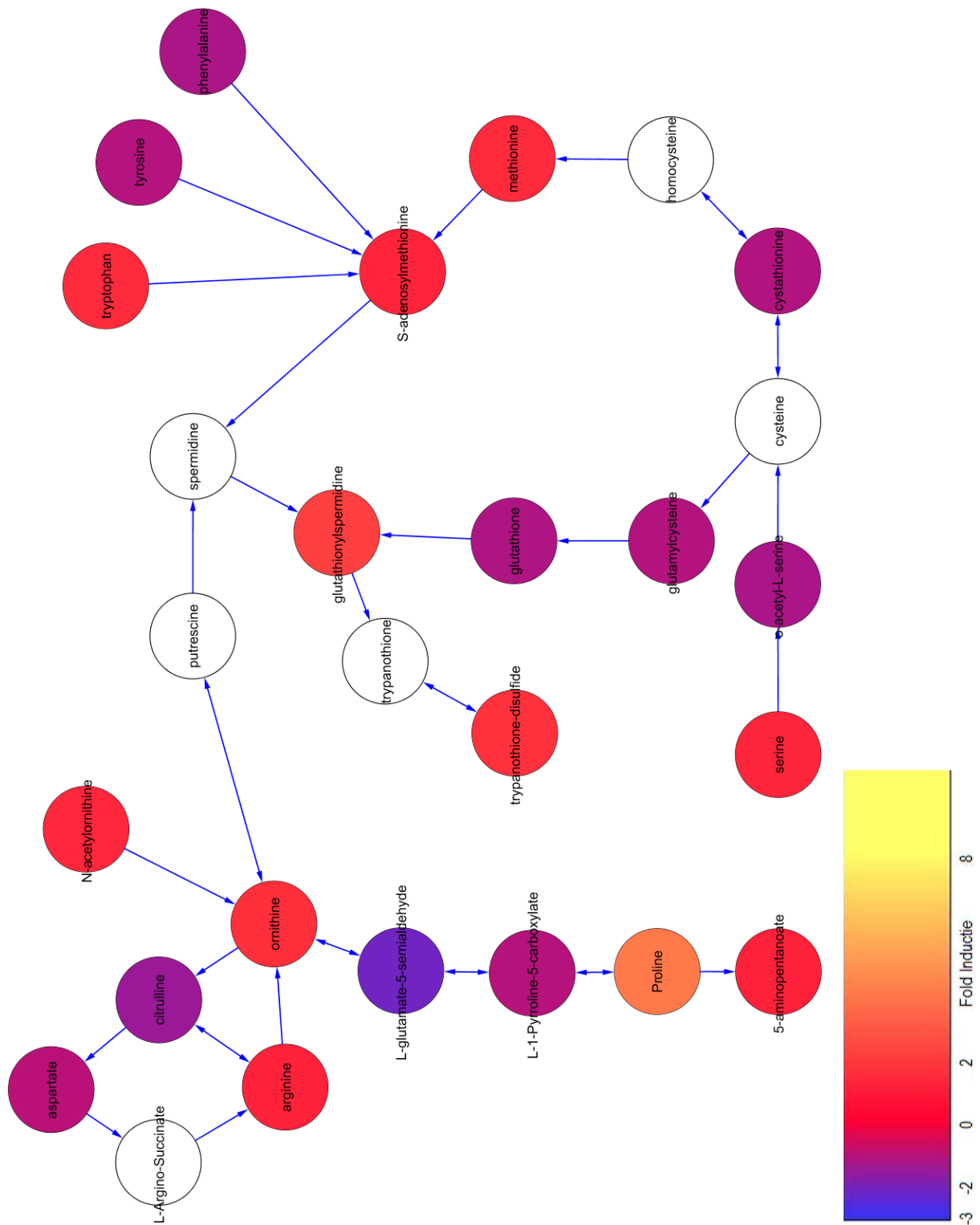




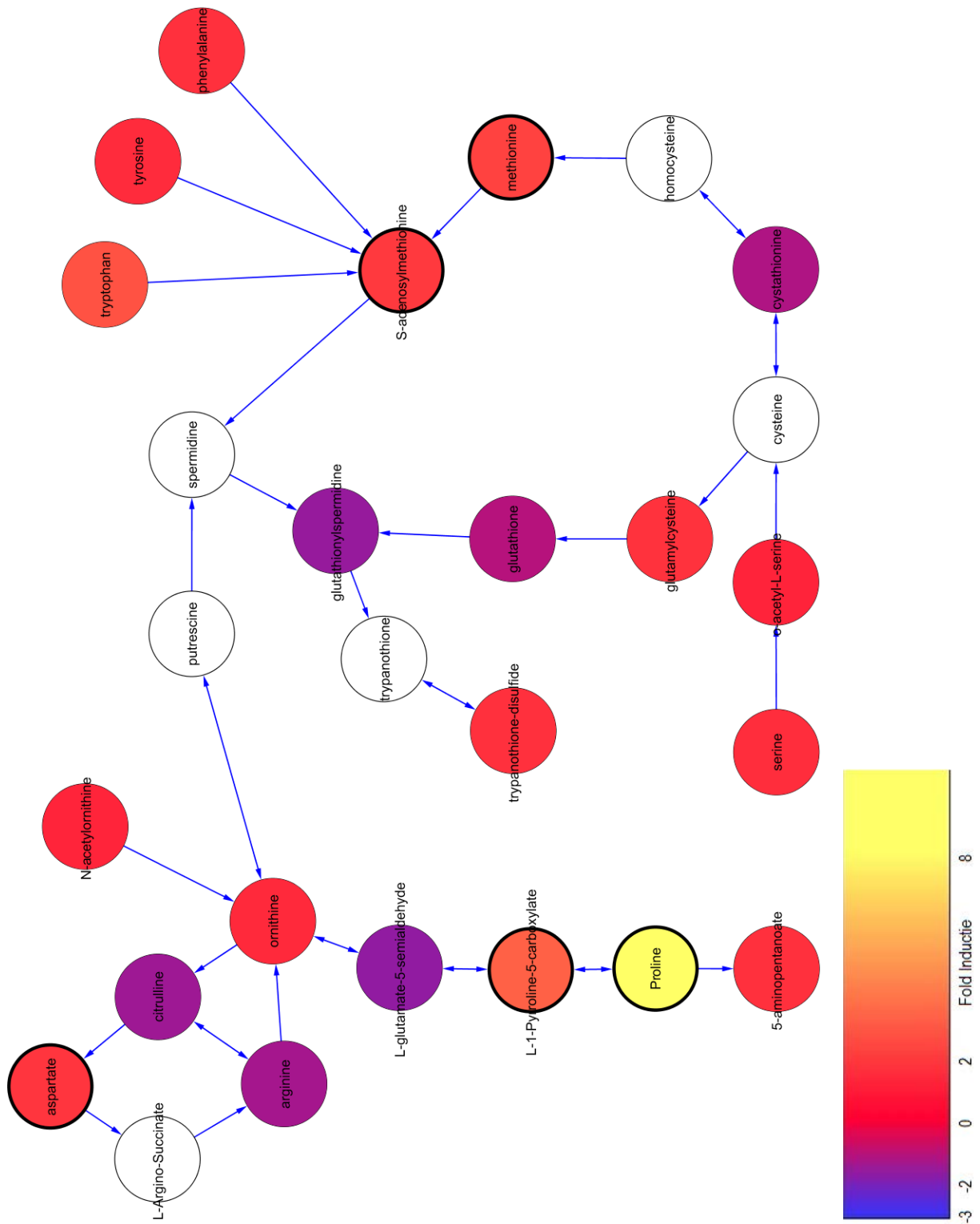
**Figuur B21:** De fold-inducties van SB-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.



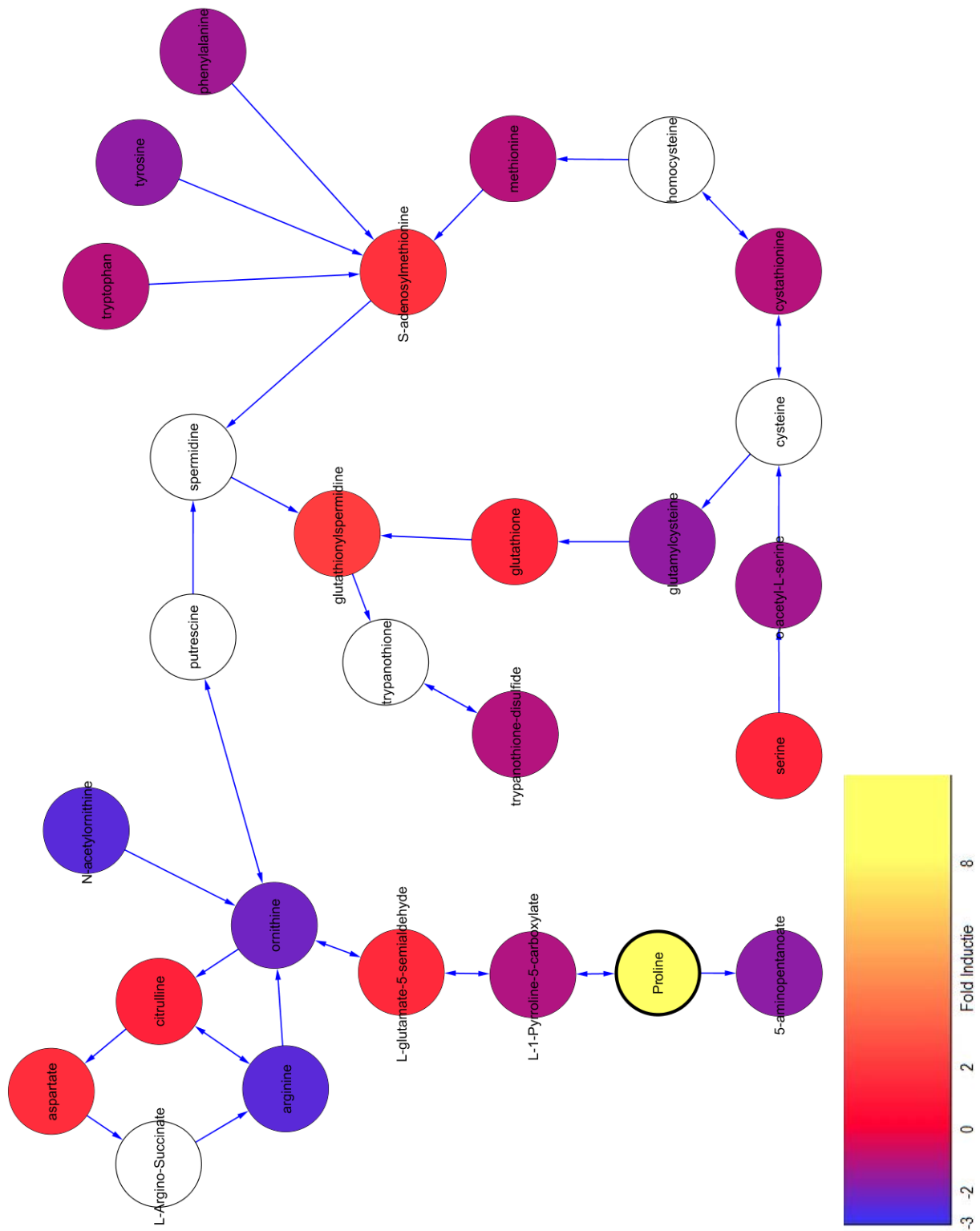
**Figuur B22:** De fold-inducties van AMB-MIL-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.



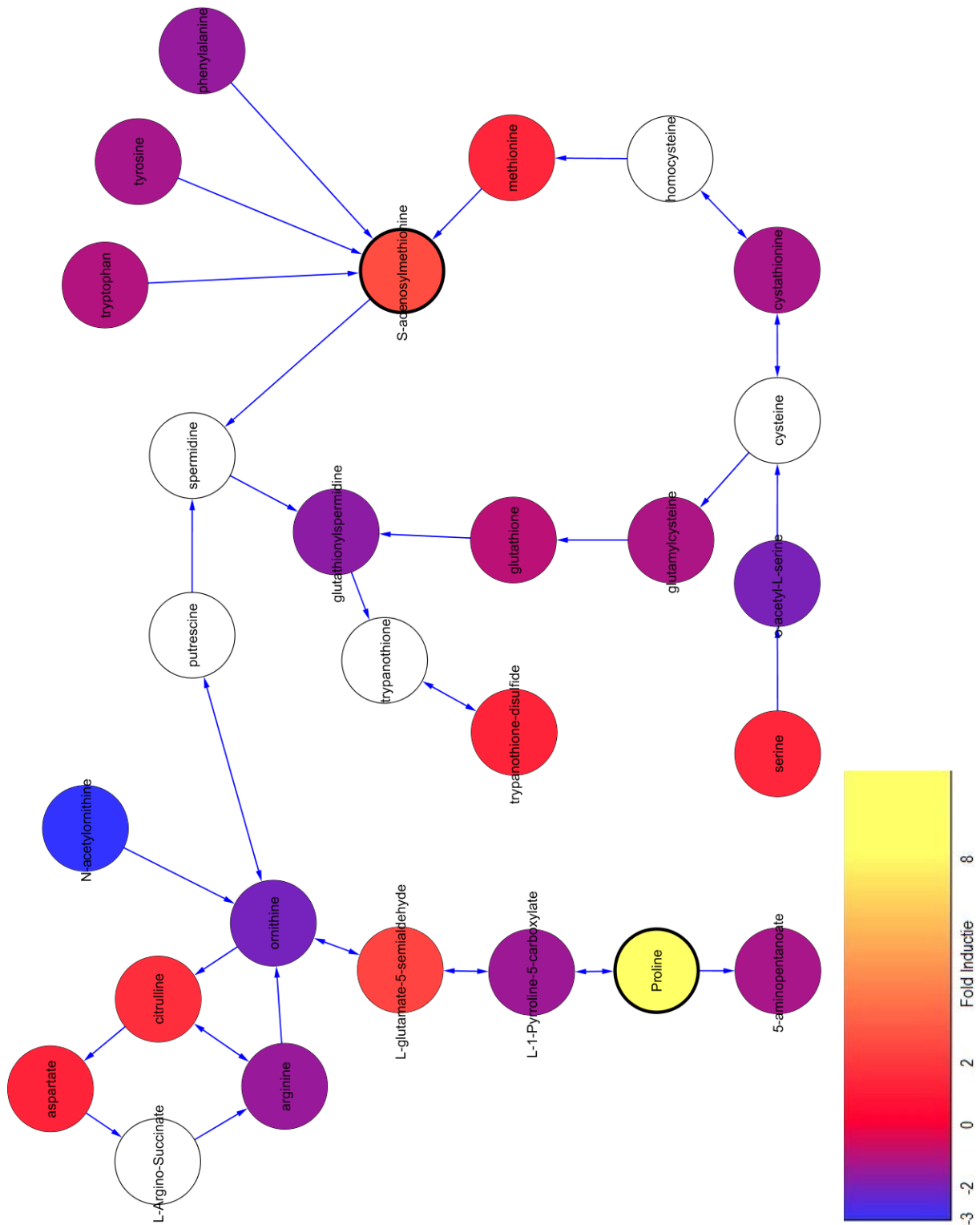
**Figuur B23:** De fold-inducties van AMB-PMM-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.



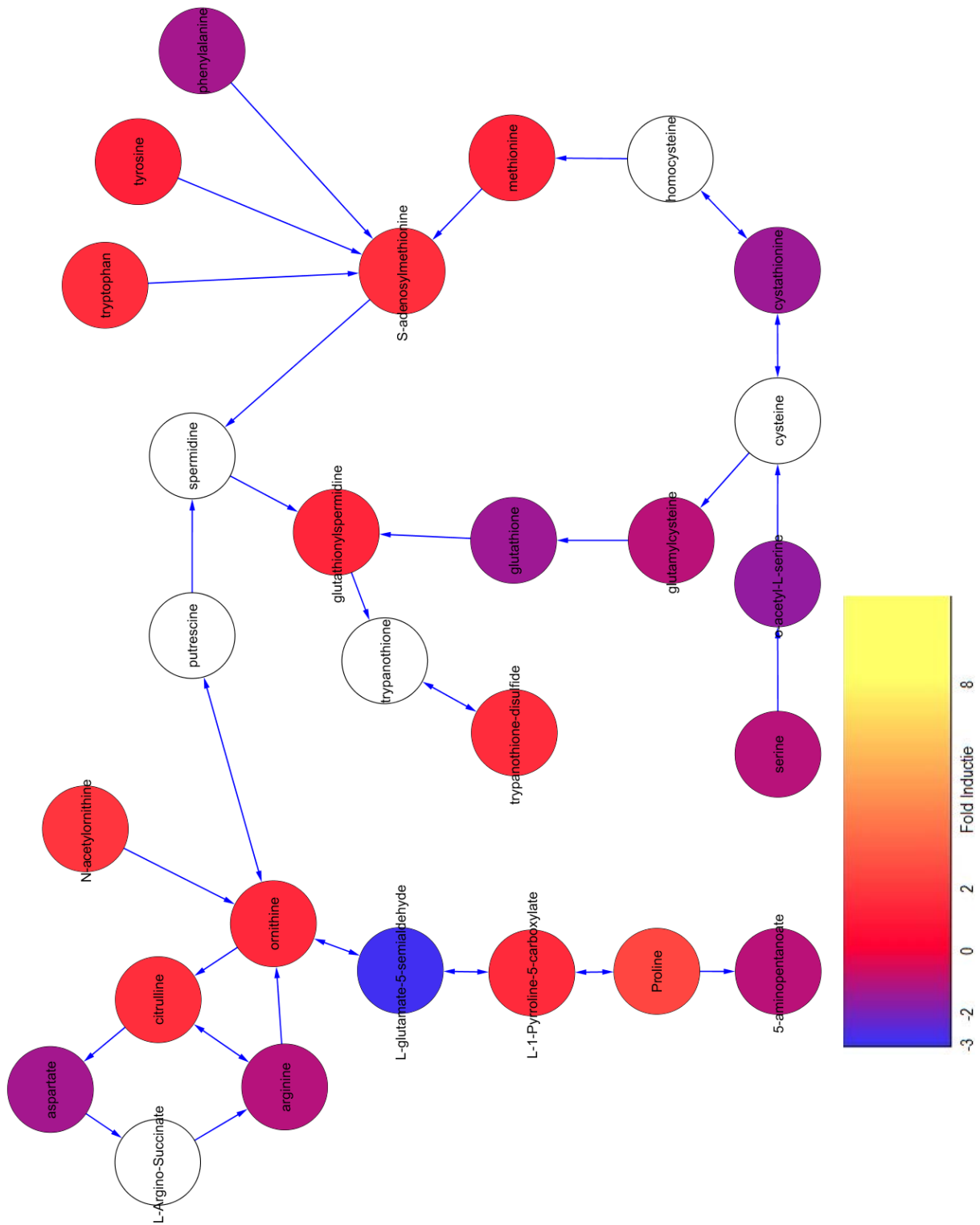
**Figuur B24:** De fold-inducties van AMB-SB-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.



**Figuur B25:** De fold-inducties van MIL-PMM-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.



**Figuur B26:** De fold-inducties van SB-PMM-R geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.



**Figuur B27:** De fold-inducties van WTO geprojecteerd op het proline metabolisme en de pathway van trypanothion productie. De kleur duidt de fold-inductie aan en de pijlen de richting waarin de reacties verlopen. Niet gedetecteerde metabolieten worden in het wit getoond. Metabolieten met een significante FI zijn vet omcirkeld. Tryptofaan, tyrosine en fenylalanine doneren enkel een aminegroep aan dit systeem.

## 8.2 Tabellen

**Tabel B1:** EC50 waarden ( $\mu\text{M}$ ) en resistentie-index (tussen haakjes) van de verschillende stammen tegen de AMB, MIL, PMM en SB. De stammen werden in stijgende concentraties van het geneesmiddel gegroeid gedurende 72u bij 28°C. Met een MTT assay werd bepaald hoeveel procent van de parasieten er nog in leven waren. De resistentie-index werd berekend door de EC50 van de stam te delen door die van het WT. Significante verschillen met het WT werden bepaald met een t-test (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$ , \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ). Analoog werden de enkel met de dubbel resistente stammen vergeleken (a:  $p < 0.001$  MIL-R vs. AMB-MIL-R of MIL-PMM-R, b:  $p < 0.05$  P vs. MIL-PMM-R of SB-PMM-R, c:  $p < 0.001$  P vs. AMB-PMM-R, d:  $p < 0.005$  SB-R vs. AMB-SB-R) (aangepast uit García-Hernández et al. (2012))

Stam	Resistentie tegen:			
	AMB	MIL	PMM	SB
WT	0.07±0.01	5.84±0.43	12.09±1.76	87.33±5.72
AMB-R	0.14±0.04* (2.00±0.57)	5.28±0.58 (0.90±0.16)	19.67±1.30**** (1.63±0.34)	74.38±4.98* (0.85±0.12)
MIL-R	0.07±0.03 (1.00±0.42)	10.5±61.06**** <sub>a</sub> (1.81±0.31)	6.93±0.80 (0.57±0.15)	92.23±7.09 (1.06±0.16)
PMM-R	0.07±0.02 (1.00±0.42)	4.98±0.38* (0.85±0.12)	133.29±12.36****,b,c (11.02±1.63)	138.15±15.54**** (1.58±0.29)
SB-R	0.07±0.02 (1.00±0.42)	4.25±0.44*** (0.73±0.13)	109.34±2.94**** (9.04±0.85)	266.07±10.12****,d,e (3.04±0.32)
AMB-MIL-R	0.14±0.04* (2.00±0.86)	18.03±1.07**** (3.09±0.40)	19.35±3.67* (1.60±0.53)	108.97±4.67**** (1.25±0.14)
AMB-PMM-R	0.14±0.04* (2.00±0.86)	10.8±61.67**** (1.86±0.42)	25.67±2.26**** (2.12±0.40)	96.69±5.60 (1.11±0.14)
AMB-SB-R	0.14±0.04* (2.00±0.86)	5.79±0.40 (0.99±0.13)	22.82±2.92**** (1.89±0.51)	178.88±5.91**** (2.05±0.49)
MIL-PMM-R	0.07±0.03 (1.00±0.56)	25.90±1.74**** (4.43±0.61)	172.27±3.52**** (14.25±1.35)	74.59±3.85** (0.85±0.10)
SB-PMM-R	0.07±0.02 (1.00±0.42)	4.61±1.02 (0.79±0.23)	221.88±30.15**** (18.35±2.15)	190.57±20.96**** (2.18±0.39)

**Tabel B2:** Lijst van de volgorde waarop de verschillende stalen onderworpen werden aan HILIC-(Orbitrap)MS. PS staat voor 'pooled sample', BR voor biologisch replicaat, TR voor technisch replicaat, AA mix voor aminozuurstandaardmix. De pooled sample werd op regelmatige wijze gemeten als kwaliteitscontrole (QC) en de biologische stalen werden gerandomiseerd over de verschillende blokken. RGH1: AMB-R, RGH2: MIL-R, RGH3: PMM-R, RGH4: SB-R, RGH5: AMB-MIL-R, RGH6: AMB-PMM-R, RGH7: AMB-SB-R, RGH8: MIL-PMM-R, RGH9: SB-PMM-R.

sample type	sample name	sample10	HU3_RGH2_BR1	sample24	HU3_RGH2_BR3	sample37	HU3_RGH9_BR4
dummy	dummy	sample11	HU3_RGH5_BR1	QC 8	PS_1/16_TR2	sample38	HU3_RGH7_BR4
dummy	dummy	sample12	HU3_WT_BR2	sample25	HU3_RGH9_BR3	sample39	HU3_RGH5_BR4
dummy	dummy	QC 4	PS_1/2_TR1	sample26	HU3_WToriginal_BR3	sample40	HU3_RGH6_BR4
dummy	dummy	sample13	HU3_RGH9_BR2	sample27	HU3_RGH4_BR3	QC 13	PS_1_TR3
blanc	extraction solvent	sample14	HU3_RGH3_BR2	sample28	HU3_WT_BR3	sample41	HU3_RGH4_BR4
standards	SCOTMET standards_1_TR1	sample15	HU3_RGH1_BR2	QC 9	PS_1/8_TR2	sample42	HU3_RGH1_BR4
standards	SCOTMET standards_2_TR1	sample16	HU3_RGH4_BR2	sample29	HU3_RGH5_BR3	sample43	HU3_RGH8_BR4
standards	SCOTMET standards_3_TR1	QC 5	PS_1/16_TR1	sample30	HU3_RGH3_BR3	sample44	HU3_WT_BR4
standards	AA mix_TR1	standards	SCOTMET standards_1_TR2	sample31	HU3_RGH6_BR3	QC 14	PS_1/2_TR3
QC 1	PS_1/4_TR1	standards	SCOTMET standards_2_TR2	sample32	HU3_RGH8_BR3	QC 15	PS_1/16_TR3
sample1	HU3_RGH3_BR1	standards	SCOTMET standards_3_TR2	QC 10	PS_1/2_TR2	blanc	extraction solvent
sample2	HU3_RGH6_BR1	standards	AA mix_TR2	standards	SCOTMET standards_1_TR3		
sample3	HU3_RGH8_BR1	QC 6	PS_1/4_TR2	standards	SCOTMET standards_2_TR3		
sample4	HU3_RGH9_BR1	sample17	HU3_WToriginal_BR2	standards	SCOTMET standards_3_TR3		
QC 2	PS_1/8_TR1	sample18	HU3_RGH8_BR2	standards	AA mix_TR3		
sample5	HU3_WT_BR1	sample19	HU3_RGH2_BR2	QC 11	PS_1/8_TR3		
sample6	HU3_RGH4_BR1	sample20	HU3_RGH6_BR2	sample33	HU3_RGH7_BR3		
sample7	HU3_RGH1_BR1	QC 7	PS_1_TR2	sample34	HU3_WToriginal_BR4		
sample8	HU3_WToriginal_BR1	sample21	HU3_RGH7_BR2	sample35	HU3_RGH2_BR4		
QC 3	PS_1_TR1	sample22	HU3_RGH5_BR2	sample36	HU3_RGH3_BR4		
sample9	HU3_RGH7_BR1	sample23	HU3_RGH1_BR3	QC 12	PS_1/4_TR3		



**Tabel B3:** Fold inductions van de verschillende metabolieten in de verschillende resistente stammen en de WTO t.o.v. het WT. Ook de klasse en hun subklasse van elke metaboliet staat weergegeven. Vet cijfer = significant na Benjamini-Hochbergcorrectie, rode metabolietnaam: hoge confidentie omdat er een standaard gelopen werd.

Metaboliet	AMB-R RGH 1	MIL-R RGH 2	MIL-R RGH 3	SB-R RGH 4	AMB-MIL-R RGH 5	AMB-PMML-R RGH 6	AMB-SB-R RGH 7	MIL-PMML-R RGH 8	SB-PMML-R RGH 9	WTO	Klasse	Subklasse
(1R,8S,10S,12S)-4-acetate, Sporangiumidine	1.29	0.71	1.71	0.79	0.99	1.58	1.47	0.51	0.51	0.89	amino acid metabolism	histidine metabolism
(5Z,7E,14S,3R)-2,4,2,4-difluoro-2,6,27-dimethyl-9,10-seco-5,7,10(19)-cholestatrien-1,3,25-triol	1.00	1.07	1.31	1.31	0.75	0.96	1.22	0.62	1.54	1.12	steroids and steroid derivatives	vitamin D2 derivatives
(5Z,7E,22E)-15,9R,20S)-9,10-seco-5,7,10(19)-22-ergostastriene-1,3,25-triol, (5Z,7E,22E)-15,9R,20S)-9,10-seco-5,7,10(19)-22-cholestastriene-3,25-diol	1.27	1.09	0.68	0.30	2.15	1.55	0.81	0.56	0.23	0.76	steroids and steroid derivatives	vitamin D2 derivatives
(S)-homoserine	1.53	2.88	5.31	3.78	3.92	3.22	8.95	7.83	6.80	1.64	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
(R)-homoserine	1.24	2.23	2.21	36.40	2.10	0.82	5.04	1.49	2.51	2.02	other	other
(S)-AMP	1.16	0.52	1.15	0.86	0.85	1.38	0.92	0.91	0.34	0.92	other	other
1,2-diacyl-sn-glycerol, 2-ketoglutaric acid	0.38	1.50	1.17	7.76	1.25	1.02	1.69	1.04	1.30	1.09	fatty acyls	dicarboxylic acids
1,3-Dimethyl-6,8-isouinolinediol, Baekeberryne	1.96	1.47	0.66	1.39	0.97	0.89	0.64	0.66	0.64	0.71	other	other
1,4-Bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate	1.34	2.70	2.30	1.29	1.22	1.96	3.79	2.24	2.24	1.66	other	other
10-pentadecanal	0.18	0.71	0.43	0.36	0.61	0.28	0.81	0.25	0.25	0.91	fatty acyls	fatty aldehydes
14-hydroxy-heneicosanoic acid, 15-hydroxy-heneicosanoic acid	0.74	0.48	0.71	0.69	1.67	0.98	1.00	1.39	1.11	0.87	fatty acyls	hydroxy fatty acids
14-methyl-all-trans-retinoic acid, LMPK13120001	0.58	0.99	1.05	0.67	0.71	1.59	0.56	0.69	0.69	0.79	prenol lipids	hydroxy fatty acids
19-hydroxy-nonadecanoic acid, 2-hydroxy-nonadecanoic acid	0.75	0.52	0.76	0.89	1.75	1.00	1.02	1.54	1.23	0.84	fatty acyls	fatty acids
1-Annicyplogranine-3-carboxylate	0.85	1.07	0.74	0.97	1.06	0.82	1.19	0.88	0.84	0.71	amino acid metabolism	cysteine & methionine metabolism
10-1-Guanidino-3-amino-1,3-dideoxy-scyllo-inositol	0.81	0.85	2.64	0.51	0.60	1.16	0.84	0.39	0.72	1.06	nucleobases	NA
1-deoxy-tetradecaphingamine	0.83	0.68	0.81	0.69	0.67	0.84	0.74	0.64	0.82	0.89	5, and sphingoid bases	sphingoid bases
1-hexadecanoyl-sn-glycerol	0.85	0.67	0.79	0.88	1.38	0.85	0.97	0.78	0.95	0.97	glycerolipids	acylglycerols
1-octadecanoyl-fruc-glycerol	0.81	0.58	0.75	0.80	1.41	0.86	0.87	0.78	0.90	0.88	glycerolipids	acylglycerols
1-O-Hexadecyl-sn-glycerol	1.11	1.03	1.11	1.09	1.10	1.03	1.06	1.03	1.13	1.09	fatty acyls	fatty ethers
1-Pyrroline, Isobutyronitrile	3.23	5.07	3.15	7.14	10.72	3.96	8.92	11.50	14.94	2.22	amino acids, peptides and amino acid conjugates	building block
2-(Hydroxymethyl)-3-(acetamidomethylene)jucconate	0.52	2.01	0.84	8.30	1.43	0.92	1.78	0.94	1.53	0.94	vitamin metabolism	Vitamin B6 metabolism
2,2,4-Trimethyl-3-(4-fluorophenyl)-2H-1-benzopyren-7-ol acetate	1.12	0.63	0.87	3.32	1.99	1.02	5.27	1.98	1.62	0.50	other	other
2,4-hexadecanoic acid, 2-(2-cyclopentyl)ethanoic acid, 5-hexynoic acid	0.06	0.53	0.34	0.21	0.48	0.27	0.45	0.97	0.23	0.50	fatty acyls	oxo fatty acids
24-methylene-cholesta-5,7,22E-trien-3beta-ol, ergostatrienol	0.72	1.11	1.07	0.78	1.03	0.67	0.54	0.80	0.81	0.99	steroids and steroid derivatives	miscellaneous steroids
2-amino-heptanoic acid	1.35	1.17	1.31	1.51	0.93	1.04	1.77	1.05	1.18	1.01	fatty acyls	fatty acids
2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate	0.79	1.57	0.90	3.00	1.88	1.36	3.37	2.15	1.72	1.09	carbohydrates and conjugate	NA
2-Furoate	0.85	2.12	2.00	1.06	1.53	1.97	1.20	1.39	2.30	1.68	other	other
2-Hydroxy-6-oxo-6-(2-carboxyphenyl)-hexe-2,4-dienoate, Maculrin	1.36	0.99	1.71	0.66	0.98	1.52	1.23	0.53	0.43	1.16	degradation	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation
2-methyl-2-icosenoic acid, 2-propyl-9Z-octadecenoic acid	0.85	0.55	0.78	0.76	1.58	1.06	1.06	1.56	1.05	0.91	fatty acyls	fatty acids
2-p-10yl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo(d)imidazo(2,1-b)thiazole	0.52	0.41	0.70	0.60	0.54	0.89	0.65	0.44	0.53	1.10	other	other
3,4-Methylenedioxy-[2',3':7']furanoflavanone	0.83	1.70	1.27	0.68	0.61	1.04	0.84	0.93	1.13	1.12	flavonoids	flavonones
3alpha-Hydroxy-6-oxo-Salpha-cholan-24-olc Acid, 3beta-Hydroxy-6-oxo-Salpha-cholan-24-olc Acid	1.10	1.37	1.41	0.60	0.90	1.07	0.72	0.59	0.54	1.43	sterol and prenol lipids	NA
3-amino-propionaldehyde	1.24	1.23	1.03	1.16	1.14	1.04	1.34	1.14	1.12	1.00	contamination	NA
3-Buten-1-amine	1.51	1.12	1.32	1.88	0.76	1.09	1.44	0.62	0.78	0.95	other	other
3-butenic acid, 2E-butenic acid	0.97	2.49	2.18	1.52	1.68	2.05	1.31	1.37	2.43	1.71	other	other
3-copaene	0.25	0.68	0.55	0.40	0.71	0.48	0.40	0.70	0.23	0.65	sterol and prenol lipids	isoprenoids
3E,13Z-octadecadien-1-ol, 11-octadecanal	0.82	0.58	0.78	0.81	1.60	1.07	0.98	1.14	1.06	0.91	fatty acyls	fatty alcohols, fatty aldehydes
3-hydroxy-3-methyl-2-oxo-butanonic acid, Pentamethic acid	1.49	4.48	2.13	4.95	1.52	1.22	2.96	1.41	2.93	1.17	fatty acyls	branched fatty acids
3-hydroxy-9,10-seco-cholestatriene-one, (5Z,7E,22Z)-(1R,3R)-9,10-seco-5,7,10(19)	2.11	1.28	1.07	0.58	2.29	2.14	2.25	0.28	0.44	1.20	steroids and steroid derivatives	vitamin D3 derivatives
3-Methylguanine, 7-Methylguanine	1.91	1.40	0.71	1.41	1.05	0.77	1.49	0.72	0.64	0.80	purines/pyrimidines and conjugates	purines
4-imidazole-5-propionic acid, imidazolelactic acid	0.80	0.68	0.69	0.86	0.66	0.55	0.93	0.70	0.58	0.65	amino acids, peptides and amino acid conjugates	NA
4-Methylene-L-glutamine	0.38	0.47	0.87	0.57	0.52	0.63	0.65	0.62	1.51	1.79	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
4-Nitrophenyl-3-ketovaldimine	1.18	0.81	1.33	0.94	0.99	1.29	1.23	1.04	0.71	1.35	other	other
5-oxoproline	0.67	2.42	2.03	9.61	1.63	0.89	0.92	0.92	1.10	0.95	amino acids, peptides and amino acid conjugates	NA
7-oxo-8-amino-nonanoic acid	0.61	0.24	0.82	0.96	1.02	0.89	3.95	0.92	1.10	0.92	fatty acyls	fatty acids
8-Oxodioxycorformycin	0.62	0.24	0.82	0.96	1.03	1.12	0.93	0.91	0.49	0.56	other	other
9,12,15-octadecatrienal, 6-[3]haderane-1-hexanol	1.01	0.99	0.89	1.06	1.03	0.92	0.89	1.16	1.24	0.83	fatty acyls	fatty aldehydes
acetyl-homoserine	1.26	1.10	1.11	0.64	0.90	1.00	1.00	0.86	0.41	1.15	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acid conjugates
acetyl-serine, glutamic acid	0.49	0.94	0.58	0.79	1.06	0.80	1.10	0.74	0.51	0.63	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
adenosine	0.52	0.46	0.90	0.25	0.36	0.99	1.10	0.17	0.08	0.68	purines/pyrimidines and conjugates	purines
Alan-Asp-Asp	0.57	0.36	0.51	0.45	0.34	0.55	0.51	0.21	0.13	1.06	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
alanine	0.95	1.27	0.64	1.17	1.22	0.84	1.03	1.05	1.04	0.55	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
allantoin	1.28	1.36	1.22	0.80	1.02	1.02	1.64	0.83	0.46	1.04	amino ketones	miscellaneous amino ketones
AMP	1.24	1.38	1.22	1.47	0.73	1.52	1.64	0.93	1.80	1.51	purines/pyrimidines and conjugates	purines
archidonic acid, eicosatetraenoic acid	1.06	0.99	1.04	1.13	1.12	1.04	1.13	1.18	1.06	1.19	fatty acyls	fatty acids
arginine	0.74	0.83	2.28	0.49	0.56	1.06	0.76	0.41	0.66	0.93	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids

	AMB-R	MIL-R	MIL-R	PM-M-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PM-M-R	AMB-SP-R	MIL-PM-M-R	SB-PM-M-R	WTO	Klasse	Subklasse
	RGH 1	RGH 2	RGH 3	RGH 4	RGH 5	RGH 6	RGH 7	RGH 8	RGH 9	RGH 9			
<b>Metabolit</b>													
Asn-Asp, Asp-Gly-Gly	0.76	0.54	0.77	0.62	0.44	0.83	0.61	0.31	0.31	0.83	1.16	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
<b>asparagine</b>	0.43	0.96	1.19	1.14	0.91	1.05	1.20	0.93	0.97	1.05	0.92	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
Asp-Arg	1.47	0.61	2.15	<b>2.29</b>	0.61	1.96	<b>3.26</b>	0.82	1.53	1.96	1.39	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
<b>aspartic acid</b>	0.50	0.98	1.11	1.20	1.33	0.99	<b>1.65</b>	1.41	1.09	1.09	0.75	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
aspartyl-glycine	0.64	0.39	0.55	0.53	0.31	0.62	0.50	0.26	0.37	0.37	1.03	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
aspartylglycosamine	1.38	0.92	0.89	1.20	0.80	1.73	1.36	0.78	1.17	1.17	0.69	carbohydrates	sugar amino acids
aspartyl-lysine, glutamyl-ornithine	1.02	0.88	1.39	1.54	0.74	1.52	1.48	0.60	0.85	0.85	1.04	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
aspartyl-phenylalanine	0.47	0.63	1.11	0.76	0.73	1.13	1.33	1.25	1.13	1.13	1.45	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
aspartyl-serine	0.66	0.46	0.93	0.64	0.45	0.91	0.60	0.37	0.58	0.58	1.24	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
aspartyl-threonine	0.87	0.37	0.62	0.71	0.38	0.88	0.66	0.23	0.43	0.43	1.10	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
C16 sphinganine	<b>0.20</b>	1.56	3.38	1.04	2.00	0.37	1.24	1.57	0.66	0.66	0.53	SL and sphingoid bases	Sphingoid base
calicoflorol D	0.85	1.23	1.06	0.68	1.08	0.97	0.81	0.85	0.81	0.81	1.00	sterol and prenol lipids	vitamins
caproylglycine, isovalerylalanine	<b>2.67</b>	1.26	<b>1.66</b>	<b>3.08</b>	1.81	1.28	<b>2.37</b>	0.77	1.00	1.00	1.69	amino acids, peptides and amino acid conjugates	acylglycines
catechol	0.99	0.78	0.76	0.73	1.24	1.13	0.88	1.56	0.90	0.90	1.07	alcohols and polyols	phenols
cinnamic acid	1.76	1.30	0.67	1.29	1.03	0.80	1.51	0.67	0.58	0.58	0.70	aromatic acids	miscellaneous aromatic acids
cis-Aconitate, trans-Aconitate	0.89	2.19	1.99	1.17	1.72	2.05	1.18	1.39	<b>2.47</b>	<b>2.47</b>	1.76	organic acids	carboxylic acids
Citramalate, Collagenase	0.44	0.90	0.91	2.18	1.16	0.82	0.95	0.82	1.59	0.82	0.78	other	other
citridine	0.66	1.33	1.66	0.58	1.46	0.68	0.70	1.05	1.43	1.43	1.45	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
<b>creatine</b>	0.77	1.84	2.13	1.62	1.15	1.87	1.10	1.01	0.92	0.92	1.58	ketones and aldehydes	amino ketones
<b>cystathionine</b>	1.12	1.21	1.46	0.88	0.62	0.89	0.85	0.93	0.79	0.79	1.69	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
<b>cytidine</b>	0.50	0.53	0.74	0.56	0.47	0.95	0.58	0.32	0.37	0.37	1.06	purines/pyrimidines and conjugates	pyrimidines
<b>cytosine</b>	2.29	3.48	1.17	4.81	1.30	2.45	5.24	3.47	3.24	3.24	2.69	purines/pyrimidines and conjugates	pyrimidines
dehydroalanine	0.46	0.95	1.09	1.19	1.28	0.97	1.61	1.33	1.07	1.07	0.71	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
dehydrophosphamine	0.37	1.50	0.45	0.31	1.19	0.46	<b>0.34</b>	0.84	<b>0.24</b>	<b>0.24</b>	1.03	SL and sphingoid bases	sphingoid bases
Demethylphosphinothricin	0.52	0.92	0.34	0.50	0.73	0.43	0.55	1.37	2.95	2.95	0.37	other	other
D-Erythulose, L-Erythulose	<b>2.02</b>	0.86	<b>3.41</b>	<b>1.83</b>	1.12	<b>2.63</b>	<b>2.21</b>	1.33	<b>2.18</b>	<b>2.18</b>	1.57	carbohydrates	monosaccharides
dimethylarginine	1.44	1.70	2.15	1.28	0.84	1.50	0.89	1.60	0.95	0.95	1.20	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
diphosphate	<b>3.25</b>	<b>2.60</b>	1.22	1.12	1.97	1.74	1.74	1.03	1.64	1.64	1.48	inorganic ions	anions
eicosapentaenoic acid	1.00	0.99	1.06	1.09	1.10	1.08	1.08	1.11	1.11	1.11	1.05	fatty acyls	fatty acids
ergosterol	0.85	1.05	1.07	0.72	1.63	1.42	0.70	0.73	0.66	0.66	0.89	steroids and steroid derivatives	vitamin D3 derivatives
Euchrenone a12	1.83	0.82	0.61	0.57	1.43	1.23	0.84	2.72	0.88	0.88	0.83	vitamins and cofactors	flavonoids
gamma-Glutamyl-gamma-aminobutyraldehyde	1.26	2.07	1.81	<b>4.74</b>	1.53	1.34	<b>2.79</b>	1.66	0.49	0.49	1.33	ketones and aldehydes	aldehydes
Glu-Ans, Asp-Gln	0.48	0.41	0.62	0.54	0.45	0.82	0.49	0.24	<b>0.31</b>	<b>0.31</b>	1.21	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
Glu-Pro	0.93	0.63	1.11	0.62	0.45	1.02	0.49	0.49	0.46	0.46	1.64	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
glutamate-semialdehyde, 2-oxo-5-amino-pentanoic acid	0.71	0.69	<b>0.33</b>	0.51	0.77	0.48	0.62	1.28	2.13	2.13	0.36	fatty acyls	fatty acids
<b>glutamine</b>	0.90	0.95	0.87	1.28	0.92	0.90	1.66	0.62	1.14	1.14	0.81	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
glutaminylalanine	1.77	3.21	0.61	<b>3.95</b>	<b>2.88</b>	0.71	1.88	1.13	<b>6.48</b>	<b>6.48</b>	1.07	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
glutaminylcysteine	0.78	0.49	0.97	0.82	0.43	1.17	0.78	0.22	0.48	0.48	1.34	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
glutathione	0.71	0.92	1.25	1.36	0.28	0.85	1.58	0.62	0.83	0.83	0.98	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
glutathionylspermidine	1.07	1.05	1.18	0.86	0.86	0.86	0.93	1.20	1.00	1.00	0.70	amino acids, peptides and amino acid conjugates	thiols
glyceric acid	1.15	0.79	0.62	2.29	0.73	2.01	0.65	1.91	0.60	0.60	1.16	thiols	NA
<b>glycerol-3-phosphate</b>	0.67	<b>3.31</b>	2.04	<b>4.25</b>	1.24	1.07	<b>2.89</b>	1.47	<b>4.12</b>	<b>4.12</b>	1.47	fatty acyls	hydroxy fatty acids
glycerophosphoinositol	0.79	1.67	1.70	<b>1.94</b>	1.62	1.48	<b>2.24</b>	<b>2.03</b>	<b>2.89</b>	<b>2.89</b>	1.81	carbohydrates	sugar phosphates
glycerylphosphorylethanolamine	1.35	1.48	1.53	0.93	0.77	1.50	0.89	0.42	1.39	1.39	0.79	glycerophospholipids	glycerophosphoinositols
<b>glycine</b>	0.80	0.58	0.91	0.77	0.37	0.53	0.60	0.35	1.25	1.25	0.51	glycerophospholipids	PE breakdown product
GPC(14/0/1)	1.16	1.35	1.06	1.05	0.91	1.21	1.21	1.08	1.38	1.38	0.77	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
GPC(15/1/1)	1.36	0.65	2.09	1.71	0.65	1.43	1.07	0.72	1.56	1.56	0.75	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(16/0/1)	<b>2.39</b>	0.81	1.38	1.14	0.95	0.86	0.94	1.07	0.95	0.95	0.94	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(18/0/1)	1.76	0.84	1.56	<b>2.23</b>	0.90	1.36	1.42	1.14	1.26	1.26	0.95	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(18/1/1)	1.49	0.96	1.42	1.32	0.86	0.99	0.99	1.15	1.12	1.12	1.12	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(18/2/1)	<b>4.00</b>	1.06	2.85	1.69	1.09	1.33	0.98	1.01	0.90	0.90	1.08	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(18/3/1)	1.62	0.63	1.48	1.44	0.64	1.09	0.77	0.41	0.82	0.82	0.86	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(18/3/1)	0.83	0.53	0.98	1.04	0.48	0.98	0.51	0.36	0.86	0.86	0.95	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(18/3/1)	0.56	0.45	1.02	0.91	0.39	0.87	0.87	0.51	0.80	0.80	0.75	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(18/4/1)	0.57	0.71	1.38	1.38	0.73	0.86	0.87	1.02	1.64	1.64	0.72	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(20-1/1)	1.49	1.06	1.66	1.74	1.29	1.66	1.28	0.80	0.92	0.92	0.88	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(20-2/1)	<b>2.59</b>	1.40	1.51	2.10	1.15	1.33	1.33	0.66	0.84	0.84	0.88	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(20-3/1)	1.25	0.91	1.21	1.60	1.12	1.13	0.91	0.62	0.71	0.71	0.85	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(22-5/1)	1.74	1.11	2.02	2.26	1.12	1.60	1.12	0.77	1.30	1.30	0.87	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(22-6/1)	1.12	0.91	1.65	1.93	0.84	1.36	0.80	0.67	1.11	1.11	0.81	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(28/0/2)	0.57	0.91	1.86	<b>2.07</b>	0.92	1.58	1.72	<b>1.76</b>	<b>3.04</b>	<b>3.04</b>	0.98	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(29-1/2)	0.95	1.10	<b>1.81</b>	1.33	1.03	1.09	1.03	1.30	<b>1.46</b>	<b>1.46</b>	0.68	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(29-2/2)	0.63	1.13	1.55	1.41	0.75	1.06	1.04	1.27	<b>2.43</b>	<b>2.43</b>	0.63	glycerophospholipids	glycerophosphocholines

Metabolite	AMB-R	MIL-R	PMIM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMIM-R	AMB-SB-R	MIL-PMIM-R	SB-PMIM-R	WTO	Klasse	Subklasse
	RGH 1	RGH 2	RGH 3	RGH 4	RGH 5	RGH 6	RGH 7	RGH 8	RGH 9			
GPC(301/2)	1.00	0.80	1.89	1.49	0.96	1.38	1.44	1.81	2.00	0.99	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(302/2)	0.55	0.80	1.39	1.53	0.74	1.53	1.48	1.19	2.06	0.80	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(312/2)	0.83	1.34	1.44	1.93	0.92	1.19	1.54	1.49	2.24	0.88	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(313/2)	0.60	0.95	1.04	1.59	0.66	0.98	1.18	1.15	1.93	0.95	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(321/2)	1.45	0.94	1.94	1.34	0.99	1.53	1.28	1.46	1.40	1.13	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(322/2)	0.84	0.81	1.50	1.22	0.80	1.32	1.07	0.84	1.50	0.87	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPP(374/2)	0.54	0.70	1.12	1.05	0.76	1.16	0.90	0.72	1.64	0.97	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(324/2)	0.42	1.03	1.29	1.14	0.93	0.85	1.19	1.71	2.47	0.70	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(303/2)	0.33	0.73	0.99	1.35	0.65	0.96	1.09	0.98	2.14	0.87	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(333/2)	1.28	1.04	1.39	1.28	0.66	0.91	1.24	1.15	2.08	0.79	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(334/2)	1.73	1.24	1.63	1.69	1.19	1.61	1.62	1.77	1.46	0.87	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(342/2)	1.07	0.99	1.24	1.51	0.97	1.27	1.34	1.04	1.21	0.97	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(343/2)	0.68	0.87	0.93	1.12	0.78	1.28	1.02	0.91	1.24	0.94	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(344/2)	0.68	0.95	1.11	1.14	0.83	1.14	1.23	1.23	1.54	0.78	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(345/2)	0.67	0.85	1.00	1.24	0.79	1.14	1.24	1.24	1.81	0.75	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(351/2)	2.08	1.35	1.85	1.33	1.10	1.35	1.16	1.25	0.89	1.31	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(352/2)	1.51	0.89	1.34	1.07	0.75	1.12	0.88	0.68	0.85	0.93	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(353/2)	1.13	0.84	1.17	0.82	0.69	1.01	0.77	0.64	0.91	0.99	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(355/2)	0.78	1.02	1.13	1.07	0.62	1.18	1.23	0.93	1.11	0.83	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(356/2)	0.56	1.09	1.03	1.58	0.83	1.13	1.91	1.52	1.92	0.86	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(365/2)	0.78	0.63	0.97	0.72	0.55	1.01	0.69	0.45	0.93	0.86	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(366/2)	0.50	0.67	0.77	0.68	0.55	0.91	0.67	0.57	1.19	0.86	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(367/2)	0.39	0.89	0.82	0.78	0.79	0.77	0.75	1.06	1.83	0.76	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(377/2)	0.89	1.27	1.38	1.43	1.01	0.82	1.26	1.26	1.90	1.02	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(380/2)	1.17	1.15	1.60	1.04	1.11	1.54	1.13	0.93	1.53	1.15	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(385/2)	1.41	1.20	1.39	1.30	1.10	1.26	1.36	0.99	1.30	1.07	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(395/2)	0.40	1.38	1.08	0.95	1.28	0.85	1.23	1.88	2.00	0.91	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(001/0/2)												
GPC(0-16/0/1)	1.03	3354.46	1.11	1.12	2850.67	1.09	0.99	2122.12	2.00	1.01	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(0-15/1/1)	0.96	0.91	1.44	1.18	0.62	0.98	1.13	0.47	1.62	1.01	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(0-16/1/1)	0.93	1.12	1.34	1.23	0.75	0.95	1.13	0.60	1.62	1.02	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(0-18/1/1)	1.01	1.23	1.45	1.23	0.87	0.94	1.04	0.83	1.74	0.98	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(0-34/2/2)	2.21	2.31	2.19	1.27	1.07	2.65	1.40	1.05	1.54	1.58	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(0-34/3/2)	1.05	2.31	1.53	1.52	1.11	1.94	1.50	0.95	2.48	1.61	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(0-34/4/2)	0.83	3.02	1.29	1.69	1.37	1.81	1.70	1.17	5.81	1.90	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(0-36/3/2)	1.01	1.94	1.64	1.09	1.10	1.34	1.35	0.99	2.21	1.63	glycerophospholipids	glycerophosphocholines
GPC(18/1/1)	3.68	1.23	1.59	1.43	1.04	1.09	1.05	1.19	0.84	0.94	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPC(21/0/1)	1.41	1.12	1.23	1.20	0.79	0.98	0.90	0.81	1.10	0.92	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(21/0/1)	1.92	0.95	1.16	1.58	1.19	0.69	1.22	1.15	0.82	1.44	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(34/2/2)	0.76	0.98	1.19	1.49	0.79	1.12	1.11	1.15	1.78	0.68	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(35/1/2), MMGPE[34.1/2]	1.48	0.93	1.88	1.34	1.04	1.52	1.58	1.24	1.60	1.17	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(35/2/2)	0.83	0.73	1.48	1.29	0.82	1.21	1.21	0.73	1.61	0.86	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(35/3/2), GPP[37.4/2]	0.49	0.73	1.01	0.95	0.63	1.17	0.81	0.69	1.58	0.89	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(36/4/2)	1.24	0.88	1.25	1.24	0.63	0.82	1.03	0.82	1.26	0.88	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(36/4/2)	0.67	0.80	0.87	1.24	0.80	1.19	1.10	0.81	1.34	0.96	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(37/4/2)	0.61	0.77	1.10	0.98	0.83	1.13	0.99	1.06	1.41	0.78	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(38/3/2)	1.07	2.41	1.18	1.15	0.83	0.97	1.13	0.89	0.81	0.96	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(38/5/2)	0.70	1.05	1.08	1.26	0.71	0.94	1.28	1.12	1.39	0.91	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(39/5/2)	0.79	0.37	0.99	0.75	0.60	0.92	0.71	0.40	0.85	0.91	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(39/6/2)	0.54	0.64	0.89	0.79	0.62	0.91	0.84	0.96	1.15	1.00	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(39/7/2)	0.41	0.96	0.87	0.93	0.83	0.83	0.84	0.96	1.82	0.95	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(0-34/3/2)	0.97	1.24	1.12	1.00	0.94	1.22	0.96	0.80	1.06	1.01	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(0-34/4/2)	0.52	1.08	0.81	0.78	0.60	1.10	0.70	0.60	0.34	0.66	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(0-35/2/2)	1.27	0.50	0.55	0.65	0.70	0.47	0.55	0.63	0.34	0.93	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(0-36/4/2)	0.75	1.13	0.93	0.74	0.82	1.04	0.75	0.74	1.04	0.96	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(34/1/2)	1.03	1.23	1.71	1.97	1.08	1.82	1.26	1.26	1.96	1.17	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(36/2/2)	0.94	1.48	1.47	1.27	0.90	1.33	1.33	0.98	1.20	1.04	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(36/3/2)	0.70	1.36	1.04	1.09	0.90	1.05	1.05	1.07	0.93	1.04	glycerophosphoethanolamines	glycerophosphoethanolamines
GPE(36/3/2)	0.89	0.63	0.98	0.56	0.71	0.57	0.52	1.38	2.86	0.69	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
guanidinobutanoic acid	1.09	0.69	0.68	0.66	0.66	0.84	0.75	1.09	0.81	0.90	acylglycerols	acylglycerols
Hexeicosanedioic acid, 1-(11E-octadecenyl)-rac-glycerol	0.89	0.63	0.98	0.66	1.57	0.57	0.52	1.38	2.86	0.69	sphingoid bases	sphingoid bases
heptadecaspinganine	0.85	1.27	0.98	1.24	1.04	0.98	1.18	1.20	1.74	0.96	St. and sphingoid bases	St. and sphingoid bases
Headecanoxic acid	0.84	0.56	0.78	0.78	1.63	1.01	1.02	1.40	1.11	1.03	fatty acyls	hydroxy acids
hexitol	0.57	0.91	0.81	1.63	1.42	1.10	2.10	2.09	5.29	0.64	carbohydrates	sugar alcohols
histidine	1.16	1.03	0.52	1.55	0.89	0.42	1.49	0.49	0.49	1.10	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids

	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO	Klasse	Subklasse
	RGH 1	RGH 2	RGH 3	RGH 4	RGH 5	RGH 6	RGH 7	RGH 8	RGH 9			
<b>Metabolit</b>												
Homomethionine	0.64	1.11	1.37	0.87	0.91	0.86	0.92	1.00	1.09	1.06	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
hydroxy-octadecanoic acid, X-hydroxy-octadecanoic acid	0.81	0.44	0.53	0.42	2.75	1.17	0.82	2.14	1.07	0.68	fatty acyls	fatty acids
hydroxy-octadecanoic acid, oxooctadecanoic acid	0.86	0.50	0.59	0.51	1.57	0.68	0.69	1.46	0.85	0.77	fatty acyls	hydroxy fatty acids
hydroxystyrene, phenylacetaldehyde	1.24	0.87	0.67	0.78	1.34	1.09	0.96	1.78	0.91	0.91	ketones and aldehydes	aldehydes
<b>hypoxanthine</b>	<b>85.26</b>	<b>45.60</b>	<b>118.38</b>	<b>70.55</b>	<b>12.93</b>	<b>15.30</b>	<b>10.38</b>	<b>117.81</b>	<b>152.47</b>	17.89	purines/pyrimidines and conjugates	purines
indole	1.36	1.09	1.14	1.88	0.65	1.09	1.42	0.61	0.75	0.97	other	NA
indoleacrylic acid	3.33	3.43	1.36	2.12	1.41	1.42	2.49	0.96	0.90	1.39	indoles and indole derivatives	indole acids
itaconic acid, citraconic acid	0.86	2.05	1.90	1.19	1.59	1.88	1.17	1.36	2.39	1.61	fatty acyls	dicarboxylic acids
kyurenic acid	1.02	1.39	1.44	0.75	0.95	1.06	0.80	1.72	0.69	1.33	other	NA
L-Cysteinylglycine disulfide	0.40	1.66	1.32	8.59	1.44	1.28	2.26	1.07	1.09	1.22	thiols	NA
Leu-Ala-Asp, Thr-Thr-Pro	0.46	0.62	0.83	0.68	0.69	0.91	0.82	0.83	0.58	0.92	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
leucine, isoleucine	1.65	1.37	1.39	2.26	1.09	1.15	1.89	1.03	1.21	1.05	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
Leucylleucine	2.32	1.88	1.66	0.74	1.12	1.09	0.87	1.07	0.64	1.27	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
Leu-Thr-Ser, Thr-Thr-Val	0.64	0.80	1.08	0.70	0.57	1.16	0.76	0.51	0.51	1.47	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
Leu-Val-Ser, Thr-Val-Val	0.38	0.68	0.77	0.67	0.86	0.98	0.55	0.81	0.28	1.08	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
lysine	1.43	1.17	2.22	1.21	0.55	1.09	1.05	0.79	0.73	1.17	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
MAG(18:0)	1.08	0.97	1.11	1.07	1.18	1.09	1.14	1.14	1.15	1.13	glycerolipids	monoacylglycerols
Malonate	0.41	0.89	1.04	1.24	1.21	0.87	1.57	1.28	1.02	0.67	others	NA
maleic acid	0.94	1.66	1.62	1.04	1.16	1.40	1.06	1.33	1.54	1.23	fatty acyls	short-chain dicarboxylic acids
malic acid	0.94	1.69	1.59	1.04	1.18	1.41	1.04	1.34	1.58	1.27	organic acids	dicarboxylic acids
methionine	1.81	1.34	1.41	2.07	1.06	1.32	2.08	0.95	1.15	1.14	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
<b>methylothoadenosine</b>	<b>0.65</b>	<b>2.33</b>	<b>1.11</b>	<b>2.54</b>	<b>1.18</b>	<b>0.80</b>	<b>1.14</b>	<b>1.14</b>	<b>1.51</b>	1.12	purines/pyrimidines and conjugates	purines
mevalonate	0.11	0.52	0.42	0.31	0.62	0.42	0.53	0.99	0.16	0.55	hydroxy acids	short-chain dihydroxy acids
MMGPE(32:0/2), GPC(30:0/2)	0.81	1.21	1.69	2.39	1.18	1.43	1.84	2.07	2.18	1.13	glycerophospholipids	glycerophosphoethanolamines
MMGPE(34:0/2), GPC(32:0/2)	0.98	1.78	1.52	1.94	1.47	1.13	1.62	2.72	1.28	1.30	glycerophospholipids	glycerophosphoethanolamines
MMGPE(36:2/2)	1.03	1.91	1.16	1.62	0.96	1.33	1.49	1.42	0.99	1.42	glycerophospholipids	glycerophosphoethanolamines
N-(hexadecanoyl)-4S-hydroxyphinganine	0.85	1.51	1.07	1.07	1.35	0.95	1.09	1.08	1.14	1.03	St and sphingoid bases	ceramides
N-Acetyl-L-histidine	2.66	1.08	1.96	1.22	1.07	1.37	1.96	0.82	0.52	1.77	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
N-Acetyl-L-phenylalanine, N-Acetyl-D-phenylalanine	3.70	1.29	1.40	8.46	0.72	1.00	6.40	0.57	2.66	2.08	amino acid metabolism	phenylalanine metabolism
<b>N-acetylorbithine</b>	<b>2.28</b>	<b>1.13</b>	<b>1.26</b>	<b>0.91</b>	<b>1.12</b>	<b>1.23</b>	<b>1.12</b>	<b>0.41</b>	<b>0.32</b>	1.65	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
nt-ribose-ring	0.61	2.61	1.72	2.83	1.24	1.54	2.09	1.45	1.17	1.51	carbohydrates	monosaccharides
octenedioic acid, 4,7-dioxo-octanoic acid	0.71	0.50	1.01	0.68	0.67	0.61	0.62	0.72	0.72	0.82	dicarboxylic acids	long chain dicarboxylic acids
oleate	0.78	0.52	0.62	0.51	2.55	1.05	0.98	1.98	1.33	0.69	fatty acyls	fatty acids
O-phosphohomoserine	3.64	1.79	0.70	1.38	0.78	0.95	1.73	0.85	1.85	0.84	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
<b>orbithine</b>	<b>1.46</b>	<b>1.07</b>	<b>1.73</b>	<b>0.74</b>	<b>1.02</b>	<b>1.46</b>	<b>1.28</b>	<b>0.48</b>	<b>1.26</b>	0.96	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
oxothiol	1.30	0.57	1.18	2.34	1.54	1.84	2.79	0.42	1.26	0.82	amino acids, peptides and amino acid conjugates	thiols
oxo-heneicanoic acid	0.77	0.53	0.70	0.72	1.54	0.87	0.77	0.91	0.85	0.87	fatty acyls	fatty acids
oxo-nonadecanoic acid	0.81	0.59	0.74	0.82	1.49	0.93	0.90	0.89	0.90	0.92	fatty acyls	fatty acids
palmitaldehyde	1.07	1.04	1.06	1.14	1.10	1.02	1.07	1.05	1.02	1.08	fatty acyls	fatty aldehydes
palmitic amide	1.01	0.54	0.81	1.02	1.68	0.77	0.89	1.76	1.19	0.94	fatty acyls	fatty amides
Phenolsulfophthalein	1.39	0.92	0.70	0.87	1.36	1.19	0.98	1.90	0.88	0.98	polyketides	NA
phenylalanine	1.93	1.38	0.75	1.38	1.04	0.82	1.49	0.72	0.65	0.75	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
phosphomolpyruvate	1.05	2.31	1.49	1.74	0.73	1.17	1.37	1.46	1.99	1.38	organic acids	hydroxy acids
<b>phosphoric acid</b>	<b>1.31</b>	<b>1.44</b>	<b>1.30</b>	<b>1.16</b>	<b>0.94</b>	<b>1.23</b>	<b>1.03</b>	<b>1.07</b>	<b>1.29</b>	1.27	inorganic ions	anions
pipicollic acid	0.82	2.56	0.65	1.21	1.15	0.39	1.18	0.87	0.47	0.50	ketones and aldehydes	amino ketones
Piperidine	1.47	1.32	1.36	1.96	1.02	1.13	1.68	0.93	1.08	0.99	secondary metabolites biosynthesis	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis
porphobilinogen	0.43	0.61	0.62	0.54	0.59	0.73	0.58	0.38	0.24	0.99	secondary metabolites biosynthesis	NA
pristanic acid, dimethyl-Heptadecanoic acid	1.17	1.16	1.15	1.20	1.20	1.11	1.21	1.16	1.15	1.10	fatty acyls	fatty acids
<b>proline</b>	<b>3.31</b>	<b>4.98</b>	<b>3.01</b>	<b>7.02</b>	<b>10.33</b>	<b>3.80</b>	<b>8.84</b>	<b>11.11</b>	<b>14.74</b>	2.19	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
proline betaine	1.70	2.41	1.60	1.42	0.96	1.10	1.27	1.03	5.47	1.27	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
prolylhydroxyproline	0.49	0.48	0.74	0.61	0.60	0.90	0.65	0.46	0.55	1.14	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
prolyl-proline	2.13	2.21	1.59	2.18	1.44	1.40	2.24	1.12	2.05	1.28	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
pseudouridine, iridine	0.97	1.97	1.09	0.96	1.03	0.81	1.12	1.12	1.18	1.24	purines/pyrimidines and conjugates	pyrimidines
Pyridoxine, L-Noradrenaline	2.30	2.98	3.49	2.41	1.70	1.57	2.46	3.45	4.64	1.93	vitamin metabolism	vitamin B6 metabolism
pyrroline carboxylate	0.71	2.17	2.01	13.49	1.98	0.94	3.05	0.87	0.69	1.32	amino acids, peptides and amino acid conjugates	conjugates
<b>S-adenosyl(methionine)</b>	<b>0.72</b>	<b>1.82</b>	<b>1.44</b>	<b>2.81</b>	<b>1.52</b>	<b>1.13</b>	<b>1.78</b>	<b>1.54</b>	<b>2.41</b>	1.43	purines/pyrimidines and conjugates	conjugates
sedoheptulose-7-phosphate	1.50	1.21	2.30	2.04	1.63	1.30	2.04	1.75	2.34	1.11	carbohydrates	sugar phosphates
<b>serine</b>	<b>0.99</b>	<b>1.27</b>	<b>1.19</b>	<b>1.11</b>	<b>1.01</b>	<b>0.96</b>	<b>1.42</b>	<b>1.13</b>	<b>1.19</b>	0.96	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
5-Methyl GSH, gamma-L-Glutamyl-L-cysteinyl-beta-alanine	0.97	0.81	1.18	0.96	0.63	0.96	0.80	0.81	0.98	0.85	amino acids, peptides and amino acid conjugates	MA
SP(34-1), N-(hexadecanoyl)-sphing-4-enine	1.02	1.27	1.16	1.22	1.01	0.88	1.06	0.91	1.13	1.13	St and sphingoid bases	ceramides
stearate	0.76	0.56	0.78	0.81	0.58	0.95	0.95	1.31	1.05	0.87	fatty acyls	fatty acids
Styrene	1.30	0.93	0.77	0.86	1.36	1.23	1.02	1.81	0.94	0.98	other	other
<b>succinic acid semialdehyde</b>	<b>0.39</b>	<b>1.50</b>	<b>1.26</b>	<b>7.81</b>	<b>1.29</b>	<b>1.07</b>	<b>1.74</b>	<b>0.98</b>	<b>1.39</b>	1.15	fatty acyls	fatty acids

Metabolit	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMIM-R	AMB-SB-R	MIL-PMIM-R	SB-PMIM-R	WTO	Klasse	Subklasse
	RGH 1	RGH 2	RGH 3	RGH 4	RGH 5	RGH 6	RGH 7	RGH 8	RGH 9			
Thr-Asp-Pro	0.29	0.67	0.88	0.58	0.29	0.93	0.35	0.22	0.34	1.64	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
threonine	1.26	1.28	0.96	1.27	1.19	0.96	1.45	1.14	1.13	0.84	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
Thr-Ser	1.02	1.02	1.39	1.78	0.82	1.43	1.89	1.12	1.43	1.54	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
Thr-Val, Leu-Ser	0.77	1.06	1.20	1.16	0.82	1.21	1.48	1.10	0.99	0.94	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
trimethyl-lysine	2.50	1.89	1.71	0.87	0.78	1.13	0.73	0.62	0.82	1.09	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
Triphosphate	0.57	1.53	1.32	1.23	1.01	1.21	0.93	1.09	1.54	1.15	other	other
trypanothione-disulfide	1.23	1.09	1.73	1.20	0.88	1.53	1.51	0.91	1.09	1.38	other	NA
tryptophan	3.22	3.44	1.29	2.12	1.42	1.36	2.58	0.94	0.89	1.42	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
tyrosine	3.45	1.32	1.01	1.45	0.68	0.92	1.33	0.61	0.77	1.01	amino acids, peptides and amino acid conjugates	amino acids
UMP, pseudouridine-5-phosphate	0.90	1.72	0.87	0.72	0.64	1.63	1.09	0.48	0.48	1.34	purines/pyrimidines and conjugates	pyrimidines
uracil	3.84	3.18	8.44	3.72	1.48	3.88	2.73	4.61	1.73	3.83	purines/pyrimidines and conjugates	pyrimidines
uric acid	0.34	1.41	0.90	0.81	0.96	1.29	0.89	0.54	5.32	1.32	aromatic acids	breakdown product of purines
Val-Ala-Asp, Leu-Asp-Gly	1.97	0.80	1.11	1.32	0.46	0.76	1.17	0.34	0.37	1.09	amino acids, peptides and amino acid conjugates	polypeptides
valerylglycine	1.52	1.13	1.27	1.98	0.64	0.99	1.50	0.60	0.38	1.03	amino acids, peptides and amino acid conjugates	acylglycines
X-amino-pentanoic acid, valine	84.22	25.81	94.38	26.33	6.55	11.42	9.61	76.24	39.35	9.12	purines/pyrimidines and conjugates	purines
X-hydroxy-hexanoic acid, 2-ethyl-2-hydroxybutyric acid	1.14	0.94	2.49	2.24	1.03	1.18	2.21	0.60	2.06	1.16	fatty acyls	fatty acids
X-oxo-hexanoic acid, X-oxo-X-methyl-pentanoic acid	1.05	1.72	2.07	2.16	0.94	1.15	3.91	0.84	2.29	0.90	fatty acyls	fatty acids

**Tabel B4:** FI van de opgepikte vetzuren die minstens in 1 stam een FI groter dan 2 of kleiner dan 0.5 hebben (Rood: FI>2, blauw FI<0.5, vet =  $q<0.05$  volgens Benjamini-Hochberg).

ID	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO
X-oxo-hexaanzuur	1.05	1.72	2.07	21.7	0.94	1.15	3.91	0.84	2.29	0.90
7-oxo-8-amino-nonaanzuur	0.67	2.42	2.03	9.61	1.02	0.89	3.95	0.92	1.10	0.92
succinaat semialdehyde	0.39	1.50	1.26	7.81	1.29	1.07	1.74	0.98	1.39	1.15
1,2-diacyl-sn-glycerol	0.38	1.50	1.17	7.76	1.25	1.02	1.69	0.94	1.34	1.09
3-hydroxy-3-methyl-2-oxo-butaanzuur	1.49	4.48	2.13	4.95	1.52	1.22	2.96	1.41	2.93	1.17
glyceraat	0.67	3.31	2.04	4.25	1.24	1.07	2.89	1.47	4.12	1.47
X-hydroxy-hexaanzuur	1.14	0.94	2.49	2.24	1.03	1.18	2.21	0.60	2.06	1.16
itaconzuur	0.86	2.05	1.90	1.19	1.59	1.88	1.17	1.36	2.39	1.61
14-hydroxy-heneicozaanzuur	0.74	0.48	0.71	0.69	1.67	0.98	1.00	1.39	1.11	0.87
oleïne	0.78	0.52	0.62	0.51	2.65	1.05	0.98	1.98	1.33	0.69
glutamaat-semialdehyde	0.71	0.69	0.33	0.51	0.77	0.48	0.62	1.28	2.13	0.36
hydroxy-octadecaanzuur	0.81	0.44	0.53	0.42	2.75	1.17	0.82	2.14	1.07	0.68
10-pentadecenal	0.18	0.71	0.43	0.36	0.61	0.28	0.35	0.81	0.25	0.91
2,4-hexadieenzuur	0.06	0.53	0.34	0.21	0.48	0.27	0.45	0.97	0.23	0.50

**Tabel B5:** FI van de opgepikte carbohydraten en conjugaten (Rood: FI>2, Blauw FI<0.5, vet =  $q<0.05$  volgens Benjamini-Hochberg).

ID	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO
2-C-Methyl-D-erythritol 4-fosfaat	0.79	1.57	0.90	3.00	1.88	1.36	3.37	2.15	1.72	1.09
Aspartylglycosamine	1.38	0.92	0.89	1.20	0.80	1.73	1.36	0.78	1.17	0.69
D-Erythrose	2.02	0.86	3.41	1.83	0.97	2.63	2.21	1.33	2.18	1.57
glycerol-3-fosfaat	0.79	1.67	1.70	1.94	1.62	1.48	2.24	2.03	2.89	1.81
Hexitol	0.57	0.91	0.81	1.63	1.42	1.10	2.10	2.09	5.29	0.64
nt-pentose-ring	0.61	2.61	1.72	2.83	1.24	1.54	2.09	1.45	1.17	1.51
sedoheptulose-7-fosfaat	1.50	1.21	2.30	2.04	0.93	1.30	1.63	1.75	2.34	1.11

**Tabel B6:** Top 20 factor loadings van principale component 2.

	Metabooliet	Positieve Loadings	Metabooliet	Negatieve Loadings
1	Acetyl-homoserine	0.128	GPC(32:4/2)	-0.133
2	Valeryl-glycine	0.114	1-Pyrroline	-0.126
3	N-acetylornithine	0.113	Proline	-0.126
4	AllantoinE	0.109	GPC(40:10/2)	-0.124
5	N-Acetyl-L-histidine	0.105	GPC(36:7/2)	-0.123
6	Ornithine	0.105	GPC(34:5/2)	-0.120
7	2-Hydroxy-6-oxo-6-(2-carboxyphenyl)-hexa-2,4-dienoaat	0.101	GPC(35:6/2)	-0.120
8	Leucyl-leucine	0.101	GPC(28:0/2)	-0.119
9	GPC(35:1/2)	0.098	GPC(31:2/2)	-0.119

10	Ala-Asp-Asp	0.095	GPC(33:3/2)	-0.117
11	(S)-AMPA	0.094	GPC(31:3/2)	-0.117
12	Adenosine	0.093	GPC(29:2/2)	-0.116
13	GPC(35:2/2)	0.093	GPC(30:2/2)	-0.110
14	Asn-Asp	0.091	GPE(39:7/2)	-0.109
15	Trimethyl-lysine	0.090	GPE(34:2/2)	-0.108
16	GPE(O-35:2/2)	0.089	Glycerol-3-fosfaat	-0.107
17	3-alpha-Hydroxy-6-oxo-5-alpha-cholan-24-oic-Acid	0.089	GPC(34:4/2)	-0.107
18	Aspartyl-threonine	0.088	Demethylfosfinothricine	-0.105
19	GPC(20:1/1)	0.088	GPC(O-34:4/2)	-0.105
20	Tyrosine	0.088	MMGPE(32:0/2)	-0.105

**Tabel B7:** Top 20 loadings van principale component 3.

	Metabooliet	Positieve Loadings	Metabooliet	Negatieve Loadings
1	N-Acetyl-L-fenylalanine	0.137	GPE(39:6/2)	-0.114
2	Methylguanine	0.131	4-Nitrophenyl-3-ketovalidamine	-0.114
3	Leucine	0.131	GPC(36:6/2)	-0.113
4	fenylalanine	0.129	Val-Ala-Asp	-0.112
5	(E)-3-fenyl-2-propeenzuur	0.126	2-p-tolyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[d]imidazo[2,1-b]thiazol	-0.112
6	Methionine	0.124	Prolylhydroxyproline	-0.111
7	Caproylglycine	0.122	4-methylene-L-glutamine	-0.110
8	1,3-dimethyl-6,8-isoquinolinediol	0.122	GPE(O-34:4:2)	-0.108
9	7-oxo-8-amino-nonaanzuur	0.114	Aspartyl-serine	-0.105
10	Piperidine	0.114	Thr-Asp-Pro	-0.105
11	Gamma-glutamyl-gammagaminobutyraldehyde	0.112	Citrulline	-0.103
12	Tryptofaan	0.111	Glu-Asn	-0.103
13	Indoleacrylaat	0.107	Leu-Val-Ser	-0.102
14	X-oxo-hexaanzuur	0.102	GPE(O-36:4/2)	-0.101
15	X-amino-pentaanzuur	0.100	Adenosine	-0.101
16	2-C-Methyl-D-erythritol-4-fosfaat	0.097	Porphobilinogeen	-0.097
17	Threonine	0.097	GPC(36:5/2)	-0.096
18	3-Buten-1-amine	0.096	3-copaene	-0.096
19	2,2,4-trimethyl-3-(4-fluorophenyl)-2H-1-benzopyran-7-ol acetaat	0.096	Leu-Thr-Ser	-0.096
20	2-(Hydroxymethyl)-3-(acetamidomethylene)succinaat	0.096	2-Furoaat	-0.095

**Tabel B8:** FI van 13 metabolieten geselecteerd uit de met de hoogste R<sup>2</sup> van de regressie tussen metabolietintensiteit en SB-resistentie (Rood: FI>2, Blauw FI<0.5, vet = q<0.05 volgens Benjamini-Hochberg). De laatste kolom toont de R<sup>2</sup> van de correlatie tussen de metabolietintensiteit en de SB-resistentie-index uit tabel 2.

ID	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO	R <sup>2</sup> SB res
Citramaat	0.44	0.90	0.91	2.18	1.16	0.82	0.95	0.82	1.59	0.78	0.80
S-adenosylmethionine	0.72	1.82	1.44	2.81	1.52	1.13	1.78	1.54	2.41	1.43	0.72
7-oxo-8-amino-nonaanzuur	0.67	2.42	2.03	9.61	1.02	0.89	3.95	0.92	1.10	0.92	0.68
X-oxo-hexaanzuur	1.05	1.72	2.07	21.76	0.94	1.15	3.91	0.84	2.29	0.90	0.68
MMGPE(36:2/2)	1.03	0.91	1.16	1.62	0.96	1.33	1.49	0.89	1.42	0.99	0.68
succinaat semialdehyde	0.39	1.50	1.26	7.81	1.29	1.07	1.74	0.98	1.39	1.15	0.67
1,2-diacyl-sn-glycerol	0.38	1.50	1.17	7.76	1.25	1.02	1.69	0.94	1.34	1.09	0.67
L-Cysteïnylglycine disulfide	0.40	1.66	1.32	8.59	1.43	1.28	2.26	1.07	1.09	1.22	0.65
2-(Hydroxymethyl)-3-(acetamidomethyleen) succinaat	0.52	2.01	0.94	8.30	1.43	0.92	1.78	0.94	1.53	0.94	0.65
N-acetyl-L-fenylalanine	3.70	1.29	1.4	8.46	0.72	1.00	6.40	0.57	2.66	2.083	0.64
(R)-(Homo)3-citrate	1.24	2.23	2.21	36.4	2.10	0.82	5.04	1.49	2.51	2.02	0.64
X-hydroxy-hexaanzuur	1.14	0.94	2.49	2.24	1.03	1.18	2.21	0.60	2.06	1.16	0.63
pyrroline carboxylaat	0.70	2.17	2.01	13.49	1.98	0.94	3.05	0.87	0.69	1.32	0.62

**Tabel B9:** FI van 14 GPLs geselecteerd uit de 20 metabolieten met de hoogste R<sup>2</sup> van de regressie tussen metabolietintensiteit en PMM-resistentie (Rood: FI>2, Blauw FI<0.5, vet = q<0.05 volgens Benjamini-Hochberg). De laatste kolom toont de R<sup>2</sup> van de correlatie tussen de metabolietintensiteit en de PMM-resistentie-index uit tabel 2.

ID	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO	R <sup>2</sup> PMM res
GPC(30:1/2)	1.00	0.80	1.89	1.49	0.96	1.38	1.44	1.81	2.00	0.99	0.78
GPC(32:4/2)	0.42	1.03	1.29	1.14	0.93	0.85	1.19	1.71	2.47	0.70	0.77
GPC(18:4/1)	0.57	0.71	1.38	1.38	0.73	0.86	0.87	1.02	1.64	0.72	0.74
GPC(29:2/2)	0.63	1.13	1.55	1.41	0.75	1.06	1.04	1.27	2.43	0.63	0.72
GPC(34:4/2)	0.68	0.95	1.11	1.14	0.83	1.14	0.97	1.23	1.54	0.78	0.71
GPC(28:0/2)	0.57	0.91	1.86	2.07	0.92	1.58	1.72	1.76	3.04	0.98	0.69
GPE(34:2/2)	0.76	0.98	1.19	1.49	0.79	1.12	1.11	1.15	1.78	0.68	0.62
GPC(36:7/2)	0.39	0.89	0.82	0.78	0.79	0.77	0.75	1.06	1.83	0.76	0.60
GPC(30:2/2)	0.55	0.80	1.39	1.53	0.74	1.03	1.48	1.19	2.06	0.80	0.58
GPC(33:3/2)	0.33	0.73	0.99	1.35	0.65	0.96	1.09	0.98	2.14	0.87	0.58
GPE(37:4/2)	0.61	0.77	1.10	0.98	0.83	1.13	0.99	1.06	1.41	0.78	0.58
GPC(31:3/2)	0.60	0.95	1.04	1.59	0.66	0.98	1.18	1.15	1.93	0.95	0.57
GPC(31:2/2)	0.83	1.34	1.44	1.93	0.92	1.19	1.54	1.49	2.24	0.88	0.57
GPC(29:1/2)	0.95	1.10	1.81	1.33	1.03	1.09	1.03	1.30	1.46	0.68	0.55



**Tabel B10:** FI van de opgepikte metabolieten van de trypanothion pathway. (Rood: FI>2, Blauw: FI<0.5 en vet:  $q<0.05$  volgens Benjamini-Hochberg).

Metaboliet	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO
acetyl-serine	0.49	0.94	0.58	0.79	1.06	0.80	1.10	0.74	0.51	0.63
arginine	0.74	0.83	2.28	0.49	0.56	1.06	0.76	0.41	0.66	0.93
citrulline	0.66	1.33	1.66	0.58	1.46	0.68	0.70	1.05	1.43	1.45
cystathionine	1.12	1.21	1.46	0.88	0.62	0.89	0.85	0.93	0.79	0.69
glutamyl-cysteine	0.71	0.92	1.25	1.36	0.28	0.91	1.58	0.62	0.83	0.98
glutathion	1.07	1.05	1.18	0.86	0.86	0.85	0.93	1.20	1.00	0.70
glutathionyl-spermidine	1.15	0.79	0.62	2.29	0.73	2.01	0.65	1.91	0.60	1.16
methionine	1.81	1.34	1.41	2.07	1.06	1.32	2.08	0.95	1.15	1.14
ornithine	1.46	1.07	1.73	0.74	1.02	1.46	1.28	0.48	0.49	1.24
S-adenosyl-methionine	0.72	1.82	1.44	2.81	1.52	1.13	1.78	1.54	2.41	1.43
serine	1.09	1.27	1.19	1.11	1.01	1.15	1.42	1.13	1.19	0.96
trypanothion-disulfide	1.23	1.09	1.73	1.20	0.88	1.53	1.51	0.91	1.09	1.38

**Tabel B11:** FI van de aromatische aminozuren (Rood: FI>2 t.o.v. WT en vet:  $q<0.05$  volgens Benjamini-Hochberg).

Metaboliet	AMB-R	MIL-R	PMM-R	SB-R	AMB-MIL-R	AMB-PMM-R	AMB-SB-R	MIL-PMM-R	SB-PMM-R	WTO
tyrosine	3.45	1.32	1.01	1.45	0.68	0.92	1.33	0.61	0.77	1.01
tryptofaan	3.22	3.44	1.29	2.12	1.42	1.36	2.58	0.94	0.89	1.42
fenylalanine	1.93	1.38	0.75	1.38	1.04	0.82	1.49	0.72	0.65	0.75
N-Acetyl-phenylalanine	3.70	1.29	1.40	8.46	0.72	1.00	6.40	0.57	2.66	2.08