

Abstract (EN)

Sialidases and trans-sialidases (TS) play important roles in the life cycles of various microorganisms. These enzymes can serve nutritional purposes, act as virulence factors, mediate cellular interactions (cell evasion and invasion) or serve as tools in bio-mimicry. In the case of the cattle infective extracellular protozoan parasite *Trypanosoma vivax*, trans-sialidase (TvTS) activity has been suggested to be involved in infection-associated anemia, which is the major pathology in Nagana disease in Africa and South America. The structure and function of TvTS remain mostly unknown. Also its role in the induction of pathology and possible drug target applications are to be discovered.

The major goals of this thesis are:

- The validation of the presence of a *T. vivax* TS during infection and the construction of a recombinant version of TvTS1 (rTvTS1),
- The structural characterization of the rTvTS1,
- The generation of a Nanobody library against rTvTS1,
- Potential enzyme inhibition and assessment of TvTS1 role in pathology

Five putative *T. vivax* TS genes were detected at the genome level and enzyme activity was confirmed in infected blood. From the 5 TS genes, *T. vivax* trans-sialidase 1 was generated synthetically and subsequently produced in yeast, purified and crystallised (rTvTS1). The obtained rTvTS1 crystals diffract to a resolution of 2.5 Å and belong to the orthorhombic space group P2₁2₁2₁ (unit-cell parameters a= 57.3, b=78.4, c=209.0 Å). The rTvTS1 enzyme consists of 3 domains: an N-terminal additional domain with unknown function, a canonical sialidase catalytic domain and at the C-terminal side a lectin-like domain. In parallel, a Nanobody (Nb) library against rTvTS1 was generated and a candidate inhibitory Nb was retrieved by activity screening. Finally, the inhibitory potential of the anti-rTvTS1 Nb and its impact on pathology were assessed *in vitro* and *in vivo*.

Abstract (NL)

Sialidasen en trans-sialidasen (TS) spelen een belangrijke rol in de levenscycli van verschillende micro-organismen. Deze enzymen kunnen van belang zijn voor nutritionele doeleinden, kunnen optreden als virulentie factoren, cellulaire interacties bemiddelen (zoals cel ontwijking of cel invasie) of als gereedschap dienen bij bio-mimetisme. In het geval van de vee-infecterende extracellulaire protozoïsche parasiet *Trypanosoma vivax* werd voorgesteld dat de trans-sialidase (TvTS) activiteit betrokken is bij de waargenomen infectie geassocieerde anemie. Deze laatste is de voornaamste bijdrager van pathologie tijdens Nagana ziekte in Afrika en Zuid-Amerika. De structuur en functie van TvTS blijven tot nog toe ongekend. Bovendien is de rol van dit enzym op het vlak van pathologie inductie en als mogelijke medicijn doelwit nog te ontrafelen.

De voornaamste doelstellingen van deze thesis zijn:

- De bevestiging van het voorkomen van een *T. vivax* TS tijdens infectie en de constructie van een recombinante versie van TvTS1 (rTvTS1),
- De structurele karakterisatie van het rTvTS1,
- De generatie van een Nanobody bibliotheek tegen rTvTS1,
- Potentiele enzymatische inhibitie en nagaan van TvTS1 bijdrage in pathologie

Vijf veronderstelde *T. vivax* TS genen werden gedetecteerd op genoom niveau en enzymatische activiteit was bevestigd in geïnfecteerd bloed. Van de vijf TS genen werd *T. vivax* trans-sialidase 1 synthetisch aangemaakt en vervolgens geproduceerd in gist, gezuiverd en gekristalliseerd (rTvTS1). De verkregen rTvTS1 kristallen diffracteren tot een resolutie van 2.5 Å en behoren tot de orthorombische ruimte groep $P2_12_12_1$ (eenheid cel parameters $a=57.3$, $b=78.4$, $c=209.0$ Å). Het rTvTS1 enzym bestaat uit 3 domeinen: een N-terminaal additioneel domein met onbekende functie, een typisch sialidase katalytisch domein en aan het C-terminaal einde een lectin-achtig domein. In parallel werd een Nanobody (Nb) bibliotheek aangemaakt tegen rTvTS1 en werd een kandidaat inhibitorische Nb ontdekt door activiteitsscreening. Ten laatste werd, zowel *in vitro* als *in vivo*, het inhibitorisch potentieel van dit anti-rTvTS1 Nb alsook de impact van TvTS1 op pathologie onderzocht.