



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The role of the tumor suppressor Lkb1 in energy homeostatis

Mans, L.A.

Citation

Mans, L. A. (2018, December 6). *The role of the tumor suppressor Lkb1 in energy homeostatis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/67528>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/67528>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/67528> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Mans, L.A.

Title: The role of the tumor suppressor Lkb1 in energy homeostatis

Issue Date: 2018-12-06

Addendum

Nederlandse samenvatting
(Dutch summary)

Curriculum vitae

List of publications



Nederlandse samenvatting (Dutch summary)

Metabolisme, de energiehuishouding van een organisme

Metabolisme is een essentieel proces dat de energiehomeostase in een organisme faciliteert, op het niveau van de (stam-) cel tot een geheel organisme. Het reguleren van dit dynamische proces is cruciaal voor de overleving van een organisme, en misregulatie kan bijdragen aan de ontwikkeling van ziektes zoals diabetes en kanker. Afwijkend metabolisme, of hypermetabolisme, is bovendien een kenmerk van kankercellen. De tumorsuppressor LKB1 speelt een essentiële en evolutionair geconserveerde rol in de regulatie van metabolisme. Mutaties die leiden tot inactiviteit van dit eiwit zijn ontdekt in veel soorten kankers en worden geassocieerd met een toename in de agressiviteit en metastasering van de ziekte. Het uitbreiden van de kennis over het effect van LKB1-inactivatie op metabolisme draagt bij aan de ontwikkeling van therapeutische behandelingen die specifiek gericht zijn op kankercellen met gemuteerd *LKB1*.

De zebravis als model om energiehomeostase te bestuderen

Gezien de complexiteit van de regulatie van metabolisme is het waardevol om de processen die hierbij betrokken zijn, te bestuderen op cellulair niveau en op het niveau van het gehele organisme. Het bestuderen van metabolisme op het niveau van de cel zal een gedetailleerd beeld geven en inzicht geven in processen zoals de regulatie van de celcyclus of de intracellulaire, celspecifieke respons op veranderingen in de omgeving. Het bestuderen van metabolisme op het niveau van een geheel organisme zal daarentegen inzicht verschaffen in de complexe respons op de beschikbaarheid en toevoer van nutriënten, de interactie tussen verschillende organen, en de endocriene signaalroutes. Ons onderzoek is gefocust op het bestuderen van de rol van *Lkb1* in en bij het aanpassen van metabolisme en het behoud van energiehomeostase in reactie op nutriëntschaarste. Een organisme als wetenschappelijk model kan daarbij waardevolle inzichten geven.

Voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift hebben we gebruik gemaakt van de zebravis, een model dat vaker gebruikt wordt bij het bestuderen van metabolisme. Zebravissen zijn gewervelde dieren, klein van formaat, en makkelijk te huisvesten. Bovendien zijn de fundamentele processen betrokken bij metabolisme geconserveerd tussen mensen en zebravissen, wat de vertaling van wetenschappelijke bevindingen naar de menselijke situatie vereenvoudigt.

De rol van *Lkb1* in de regulatie van energiehomeostase

Het werk in dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar de effecten van *Lkb1*-in-

activatie op energiehomeostase in zebravislarven. Een zebravislarve ontstaat door externe bevruchting van een eicel. Het zich ontwikkelende embryo wordt de eerste dagen van de ontwikkeling voorzien van nutriënten vanuit de dooier. Rond 5 dagen na de bevruchting raakt de dooier op en moet de larve overgaan op het actief zoeken naar voedingsstoffen uit externe bron. Tijdens deze overgangperiode krijgt de larve te maken met nutriëntrestrictie, wat, om te kunnen overleven, aanpassing van metabolische processen vereist. Hierbij worden processen die energie kosten afgeremd, terwijl processen die energie genereren juist worden geactiveerd. Onze onderzoeksgroep heeft eerder beschreven dat *Lkb1* essentieel is voor de overgang van de nutriëntrijke naar de nutriëntarme situatie. Larven met een mutatie in *lkb1* vertonen kort na het opraken van de dooier, rond 7 dpf, kenmerken van extreme honger en overlijden kort hierna. Wildtype-larven, die niet gevoed worden, vertonen deze kenmerken echter pas rond 11 dagen na bevruchting en overlijden enkele dagen later.

Om verder uit te zoeken welke metabole processen *Lkb1* reguleert en wat de gevolgen zijn van inactivatie van *Lkb1* hebben we ons gefocust op (1) het bestuderen van de metabole processen die geassocieerd worden met nutriëntrestrictie: glucosemetabolisme en autofagie, (2) het samenstellen van een profiel van genen die specifiek gereguleerd worden door *Lkb1*, en (3) het bestuderen van de effecten van *Lkb1*-inactivatie op het behoud en de ontwikkeling van bloed(stam-)cellen. Daarnaast hebben wij ons gericht op (4) het gebruiken van *lkb1*-larven als screeningplatform om therapeutische middelen te identificeren die specifiek gebruikt kunnen worden tegen kankercellen waarin *LKB1* is gemuteerd.

Lkb1 is een cruciale regulator van autofagie tijdens nutriëntrestrictie

Autofagie is een proces dat cellulair materiaal afbreekt. Onder basale, normale condities faciliteert dit proces de recycling en afbraak van cellulaire producten die niet (meer) nodig zijn of niet goed functioneren. Echter, in geval van nutriëntstress kan ditzelfde proces ingeschakeld worden om cellulair materiaal af te breken dat vervolgens als substraat kan dienen voor het genereren van energie (Rabinowitz and White, 2010). In muizen is aangetoond dat het uitschakelen van autofagie leidt tot sterfte kort na de geboorte (Kuma et al., 2004), wat aangeeft hoe belangrijk dit proces is na het afbreken van de nutriënttoevoer van de moeder. In de zebravis is de rol van autofagie bij de overgang van dooier naar externe voeding nog niet onderzocht. In Hoofdstuk 2 laten we zien dat wildtype-larven tussen 5 en 7 dagen na bevruchting, gedurende het opraken van de dooier, autofagie induceren. Echter, in *lkb1*-larven observeerden we minder autofagie en een verder afname hiervan gedurende de tijd, wat duidt op een autofagiedefect. Bovendien observeerden we

dat de autofagiereceptor en scaffold-eiwit Sqstm1/p62 ophoopt in de lever en in het darmstelsel van *lkb1*-larven, wat het defect in autofagie verder bevestigt. Om te bepalen in hoeverre het defect in autofagie verantwoordelijk is voor het fenotype van *lkb1*-larven hebben we geprobeerd om autofagie te activeren. Het activeren van autofagie via de mTOR- en PI3K-signalroutes was succesvol in wildtype-larven, maar niet in *lkb1*-larven. Dit niet geheel tot onze verassing, aangezien deze signalroutes worden beïnvloed door de inactiviteit van Lkb1. Interessant is dat wanneer larven behandeld werden met calpeptin, dat onafhankelijk van de mTOR- en PI3K-signalroutes werkt, autofagie wordt geactiveerd, in zowel wildtype-larven als *lkb1*-larven. Bovendien zorgt behandeling met calpeptin ervoor dat in *lkb1*-larven geen p62 meer ophoopt en de levensduur wordt verlengd.

De precieze moleculaire signalroutes die ten grondslag liggen aan het gebrek aan activatie van autofagie in *lkb1*-larven na het opraken van de dooier zijn helaas nog niet geheel duidelijk. Desalniettemin laten wij met ons onderzoek zien dat het activeren van autofagie in reactie op nutriëntrestrictie ook in zebrafissen een essentieel overlevingsproces is, en dat Lkb1 cruciaal is voor deze activatie.

Lkb1 is essentieel voor glucosemetabolisme

Glucose is het belangrijkste molecuul dat als ‘brandstof’ gebruikt wordt in een organisme. Voedsel wordt, na inname, afgebroken tot kleine moleculen zoals glucose. Glucose wordt vervolgens in de bloedbaan vrijgegeven waarna het door cellen kan worden opgenomen. Als de voedselinname schaars is en het bloedsuikerniveau daalt, kan een organisme gebruik maken van glucose dat in de lever is opgeslagen in de vorm van glycogeen. Als deze reserve opraakt dan kunnen ook niet-koolhydraatmoleculen gebruikt worden voor het genereren van glucose, via het proces van gluconeogenese. Bij zebrafissen is bekend dat het opraken van de dooier gluconeogenese activeert (Gut et al., 2013). In **Hoofdstuk 3** laten we zien dat genen die geassocieerd worden met gluconeogenese vervroegd en verhoogd tot expressie komen in *lkb1*-larven. Echter, ondanks de toename in expressie van deze genen is de hoeveelheid glucose in *lkb1*-larven drastisch lager. Dit duidt erop dat Lkb1 essentieel is voor het behoud van glucose- homeostase.

Kenmerken van *lkb1*-larven vóór het opraken van de dooier

Het fenotype van *lkb1*-larven na het opraken van de dooier bevestigt dat Lkb1 essentieel is voor overleving na het opraken van de dooier. Tijdens onze experimenten vonden wij echter ook verschillen tussen *lkb1*- en wildtype-larven vóór het opraken van de dooier. In **Hoofdstuk 2** bijvoorbeeld, observeerden we de verlaagde expressie van autofagiemarkers en accumulatie van p62 in *lkb1*-larven al op 5 dpf.

Daarnaast vonden wij bij de transcriptoomanalyse, beschreven in **Hoofdstuk 4**, een profiel van genen die alléén in *lkb1*-larven misregulatie vertonen zowel op 5 als 7 dpf, wat duidt op Lkb1-specifieke effecten onafhankelijk van het opraken van de dooier. Het zou interessant zijn om te onderzoeken of deze kenmerken een causale rol spelen in de ontwikkeling van het metabole fenotype van *lkb1*-larven na het opraken van de dooier.

Lkb1- larven vertonen kenmerken van cachexia

Cachexia, of ‘wasting syndrome’, wordt geassocieerd met een vergevorderde status van verschillende soorten ziekten zoals infectieziekten en kanker. Patiënten worden gekenmerkt door gewichtsverlies, atrofie van de spieren, afwijkend metabolisme, ontstekingen en bloedarmoede. Ondanks de ernstige karakteristieken zijn de moleculaire mechanismes die ten grondslag liggen aan cachexia nog niet geheel duidelijk. In **Hoofdstuk 4** laten wij zien dat een set genen die geassocieerd wordt met cachexia sterk in expressie verhoogd is in *lkb1*-larven. De onderliggende oorzaak en het gevolg van de inductie van deze cachexia-geassocieerde genen is onduidelijk. Interessant is dat, hoewel de meeste genen pas bij 7 dpf significant verhoogd tot expressie komen, *calpain 3* al verhoogd is op 5 dpf. Dit kan erop wijzen dat calpain een causale rol heeft in de ontwikkeling van het cachexia-achtige fenotype van *lkb1*-larven. Interessant is bovendien dat we in **Hoofdstuk 2** laten zien dat behandeling van *lkb1*-larven met een inhibitor van calpainen resulteert in verlengde levensduur.

Aangezien de *lkb1*-zebravis kenmerken vertoont van het cachexia-fenotype, denken wij dat het als model gebruikt zou kunnen worden voor het doorgronden van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de cachexia-pathofysiologie.

Lkb1 en systemisch metabolisme zijn belangrijk voor hematopoëse

Onderzoek naar de effecten van (systemisch) metabolisme op het behoud en functioneren van (stam-)cellen staat sterk in de belangstelling. In **Hoofdstuk 5** geven we een overzicht van verschillende signalroutes die beschreven zijn in het reguleren van energiehomeostase en systemisch metabolisme in stamcellen, waaronder ook de signaalroute van LKB1. De rol van LKB1 in stamcellen is verder onder de aandacht gekomen nadat beschreven werd dat LKB1 een cel-autonome rol geeft in het behoud van bloedstamcellen (Gan et al., 2010; Gurumurthy et al., 2010; Nakada et al., 2010a). Echter, het effect van systemische inactivatie van LKB1 op het functioneren en behouden van bloedstamcellen is nooit onderzocht. In **Hoofdstuk 6** beschrijven we dat systemische inactivatie van Lkb1 weinig effect heeft op het

behoudt van bloedstamcellen. We observeerden wel een subset van *lkb1*-larven (~20%) die geen bloedstamcellen in de thymus hadden gedurende de gehele ontwikkeling tot 7 dpf. Dit is raadselachtig, aangezien het suggereert dat Lkb1 belangrijk is voor het koloniseren van de thymus, maar slechts in een klein percentage van de larven. Verder laten we zien dat de neutrofielpopulatie op 7 dpf drastisch verminderd is in *lkb1*-larven, wat suggereert dat dit fenotype een resultaat is van de combinatie tussen de afwezigheid van Lkb1 en de metabole stress die gepaard gaat met het opraken van de dooier.

Ten slotte laten we zien dat in *lkb1*-larven de expressie van *gata1*, een gen dat tot expressie komt in erythrocyten (rode bloedcellen), gedurende de gehele ontwikkeling afwezig is. Deze afwezigheid suggereert dat Lkb1 essentieel is voor de ontwikkeling van erythrocyten. Al deze resultaten samen geven aan dat Lkb1 én systemisch metabolisme beide invloed hebben op de ontwikkeling en het behoud van bloed(stam-)cellen, en dat verder onderzoek naar de (in)directe rol van Lkb1 in hematopoëse nodig is.

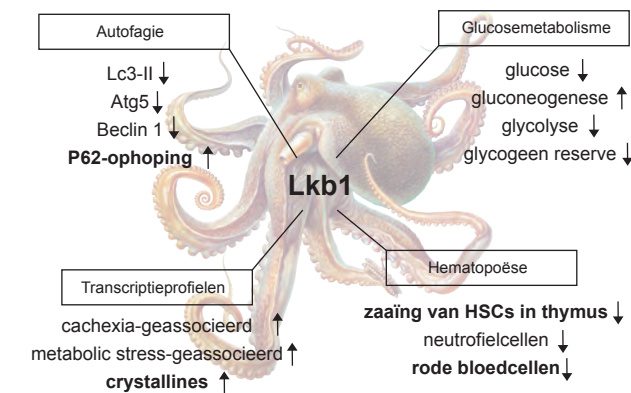
De *lkb1*-zebravis als onderzoeksmodel

Het reguleren van metabolisme in een organisme vindt plaats door communicatie tussen verschillende organen bij het aanpassen aan externe signalen (nutriënten, zuurstof) alsmede interne signalen (hormonen, glucoseniveau, aminozuren en lipiden). Om die reden kunnen cel-gebaseerde experimenten niet de complexiteit van een organisme nabootsen. Het gebruik van een organisme als model heeft in dit geval de voorkeur. Zoals eerder beschreven, is de regulatie van metabolisme sterk geconserveerd tussen mens en zebravis, wat het een uitgelezen model maakt voor ons onderzoek. Echter, het gebruik van een organisme bij experimenten brengt ook nadelen met zich mee. Naast dat het reguleren van metabolisme een complex mechanisme is, is het soms lastig om directe effecten te onderscheiden van indirecte effecten. Zo is het bijvoorbeeld lastig om aan te tonen of de waargenomen verschillen in metabole processen tussen wildtype en *lkb1*-larven het resultaat zijn van de directe regulatie van Lkb1, of van de indirecte effecten van inactivatie van Lkb1. Desalniettemin geven wij nieuwe inzichten in de effecten van het uitschakelen van Lkb1 in het gehele organisme, met name op gebied van energiehomeostase.

De potentiële waarde van de *lkb1*-zebravislarven in het onderzoeksveld van metabolisme gaat echter verder dan het ontdekken en beschrijven van verstoorde signaalroutes. De synthetisch-lethale screen die beschreven wordt in **Hoofdstuk 3**, demonstreert dat de *lkb1*-zebravis een geschikt platform is om medicijnen te ontdekken die zich specifiek richten op gemuteerd Lkb1. Wat bij kan dragen aan de zoektocht naar medicijnen tegen *LKB1*-gemuteerde kankercellen.

Conclusie

Het werk in dit proefschrift beschrijft de fundamentele rol van Lkb1 als dirigent van metabolisme-gerelateerde processen in zebravislarven (Figuur 1). We laten zien dat Lkb1 essentieel is voor het reguleren van glucosemetabolisme, de activatie van autofagie en hematopoëse gedurende condities van metabole stress. Daarnaast hebben we ook transcriptieprofielen en hematologische karakteristieken ontdekt die specifiek zijn voor *lkb1*-larven vóórdat de dooier is opgebruikt. Tenslotte benadrukken we het potentieel van de *lkb1*-zebravis als screeningplatform in onderzoek gerelateerd aan metabolisme, hematologie, en *LKB1*-tumoren. Samengevat bevestigen onze resultaten de waarde van *lkb1*-larven als onderzoeksmodel bij het ontrafelen van de rol van Lkb1 in energiehomeostase.



Figuur 1. Lkb1 als dirigent van metabolisme-gerelateerde processen. Lkb1 heeft een essentiële rol in de regulatie van metabolisme op het niveau van de cel en het gehele organisme. De wetenschappelijke data in dit proefschrift laat zien dat Lkb1 betrokken is bij de regulatie van glucosemetabolisme, autofagie, genexpressie en hematopoëse. Onder elk proces staan de moleculaire karakteristieken van *lkb1*-zebravislarven op 7 dpf, na het opraken van de dooier. De pijlen representeren toe- en afname in vergelijking tot wildtype-larven op 7 dpf. De vetgedrukte karakteristieken zijn al waarneembaar op 5 dpf, voordat de dooier is opgebruikt.

Referenties

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* 468, 701-704.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* 468, 659-663.

Gut, P., Baeza-Raja, B., Andersson, O., Hasenkamp, L., Hsiao, J., Hesselson, D., Akassoglou, K., Verdin, E., Hirschey, M.D., and Stainier, D.Y. (2013). Whole-organism screening for gluconeogenesis identifies activators of fasting metabolism. *Nat Chem Biol* 9, 97-104.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.

Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* 468, 653-658.

Rabinowitz, J.D., and White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science* 330, 1344-1348.

