



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Developing metabolomics for a systems biology approach to understand Parkinson's disease

Willacey, C.C.W.

### Citation

Willacey, C. C. W. (2021, September 8). *Developing metabolomics for a systems biology approach to understand Parkinson's disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3209244>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3209244>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3209244> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Willacey, C.C.W.

**Title:** Developing metabolomics for a systems biology approach to understand Parkinson's disease

**Issue Date:** 2021-09-08

### **Samenvatting**

Neurodegeneratieve ziekten, waaronder de ziekte van Parkinson (PD), komen steeds vaker voor als gevolg van de vergrijzing van de bevolking. Ondanks uitgebreid onderzoek zijn deze ziekten nog steeds niet volledig begrepen en het gebrek aan gepersonaliseerde behandelingsopties die zich kunnen richten op de oorzaak van de ziekten, in plaats van op de symptomen, heeft geleid tot een grotere vraag naar beter ziekte-inzicht, therapieën en diagnostische procedures. In dit proefschrift gebruiken we systeembioïogische benaderingen om ziektespecifieke modellen te construeren die bedoeld zijn voor de ontdekking van biomarkers, de identificatie van therapeutische behandelingsstrategieën en de herbestemming van geneesmiddelen voor PD. Systeembioïogie is een wiskundig onderzoeksgebied dat biologische systemen analyseert via de constructie van een computationeel model met behulp van experimentele gegevens. Dit wordt bereikt door integratie van omics-gegevens, waaronder genomics, proteomics, transcriptomics en metabolomics. Een specifieke aanpak die wordt gebruikt om de fysisch- en biochemische grenzen binnen een biologisch systeem te bepalen is constraint-based modelling, waarvoor de input van absolute kwantitatieve metabolomics-gegevens vereist is. Om onze absolute kwantitatieve dekking van het metaboolom te verbeteren, hebben we nieuwe kwantitatieve metabolomics methoden ontwikkeld en verbeterd met behulp van een gerichte MS workflow om gegevens te verkrijgen die bedoeld zijn om te worden geïntegreerd in constraint-based metabole modellen voor de studie van PD. Een subset van PD wordt geassocieerd met mitochondriale disfunctie voor een reeks van genetische mutaties, consistent met het sterke verband tussen mitochondriale functie en PD, met veel van de geassocieerde metabolieten die betrokken zijn bij de TCA-cyclus en energiemetabolisme. Daarom werden metabolomics-methoden gebruikt om metabolieten van het centrale koolstof- en energiemetabolisme en specifieke neurochemicaliën absoluut te kwantificeren. Door de uitgestrektheid van het metaboolom en de moeilijkheid bij het bereiken van een hoge dekking van metabolieten binnen een biologische matrix, hebben we chemische derivatisering gebruikt om de detectie en kwantificering van een groter deel van de metabolieten in humane urine, SUIT-2-cellen, HepG2-cellen, rattenhersenen en geïnduceerde pluripotente stamcel (iPSC)-afgeleide dopaminerge neuronen te verbeteren. Om de realistische biologische omgeving te evalueren, wordt het gebruik van 3D-celcultuur microfluidische apparaten steeds populairder. Dit leidt echter tot een kleinere

steekproefgrootte. Materiaal-beperkte stalen vormen een uitdaging voor de metabolomics gemeenschap omwille van de vereiste gevoeligheid. Chemische derivatisering kan de detectie bevorderen door de gevoeligheid te verhogen en andere voordelen te bieden, zoals een grotere selectiviteit en scheiding. Er is ook een gebrek aan bestaande absolute kwantitatieve metabolietreferentiewaarden (met specifieke aandacht voor de hersenen van zoogdieren), wat essentieel is voor integratie in metabolische modellen. Bovendien veranderen metabolietprofielen naargelang het celtype, de hersenenregio en de functie. Om deze redenen streven we ook naar de absolute kwantificering van neurochemicaliën die worden aangetroffen in rattenhersenen, d.w.z. het zoogdierenbrein. Tenslotte integreren we multi-omics data van de iPSC-afgeleide dopaminerge neuronen in een op genome-schaal constraint-based reconstructie- en analysemodel dat gebruikt kan worden om de complexiteit van PD te begrijpen.

Om de reis naar een uitgebreid PD model te beginnen, richtte **hoofdstuk 2** zich op de problemen bij het bereiken van een brede dekking en absolute kwantificering van het metaboloom door het creëren van een high-throughput, betrouwbare, enkele, pre-kolom derivatisering RPLC-MS/MS analyse met een 10-minuten acquisitietijd met behulp van alleen positieve ionisatie-modus. Met behulp van de chemische derivatisering reagens dimethylaminophenacyl bromide (DmPABr), waren we in staat om gelijktijdig label carbonzuren, thiolen en aminen waarvan slechts enkele gepubliceerde methoden met succes hebben gericht samen. Deze groepen zijn overvloedig aanwezig in de metabolieten van het centrale koolstof- en energiemetabolisme, zodat wij de concentraties van deze metabolieten konden kwantificeren. Om de kwantificering verder te verbeteren, hebben we ook isotoop-gecodeerde derivatisering (ICD) toegepast door het gebruik van interne standaarden met een isotopisch gelabeld reagens (DmPABr-D<sub>6</sub>). In humane urine en SUIT-2 cellen, hebben we 64 centrale koolstof en energie-gerelateerde metabolieten, waaronder aminozuren, N-geacetylerde aminozuren, metabolieten uit de TCA-cyclus en pyruvaatmetabolisme, acylcarnitines en middellange/ lange-keten vetzuren, gedetecteerd en gekwantificeerd. Wij hebben het vermogen van de methode om mitochondriale disfunctie te identificeren aangetoond door blootstelling van SUIT-2 cellen aan 100 nM rotenon. Na de behandeling vertoonden 50% van de gedetecteerde metabolieten significante veranderingen.

## Addendum

Een ander veelvoorkomend probleem voor wetenschappers bij metaboliëtdetectie en -kwantificatie is de gevoeligheid, vooral bij lage volumes of concentraties van monsters. **Hoofdstuk 3** past de derivatiseringsmethode en ICD zoals beschreven in **hoofdstuk 2** op materiaal-gelimiteerde cel monsters toe op het verbeteren van de chromatografische scheiding en het verbeteren van MS ionisatie. Na snelle en toegankelijke derivatisering met DmPABr, pasten we onze nieuwe RPLC-MS/MS-methode toe op HepG2 cellen, variërend van 250 cellen tot  $1 \times 10^5$  cellen. In sub-10.000 cellen waren we in staat om 37 metaboliëten te detecteren en te kwantificeren, en nog eens 11 metaboliëten werden gedetecteerd onder de LLOQ.

In **hoofdstuk 4** pakken we het huidige gebrek aan beschikbare absolute kwantitatieve zoogdierhersenen metabolië referentiewaarden aan door het kwantificeren van neurochemicaliën in 25 geïsoleerde regio's van rattenhersenen om een uitgebreide metabole atlas van de zoogdierhersenen te produceren. De nadruk ligt op de hersengebieden die in verband worden gebracht met PD en andere neurologische aandoeningen, waaronder de orbitofrontale cortex, de hersenschors, de frontale kwab, de ventromediale prefrontale cortex, de subcorticale structuur en de hersenstam. Wij hebben de LLE-extractie geoptimaliseerd alvorens de LC-MS/MS-techniek voor derivatisering toe te passen. In dit geval gebruikten wij het benzoylchloride derivatiseringsreagens omdat dit, in tegenstelling tot DmPABr, het vermogen heeft kwetsbare catecholamines te stabiliseren en neuroactieve metaboliëten te vangen. Met onze methode konden wij een concentratieprofiel opstellen van 43 metaboliëten, waaronder belangrijke neurotransmitters zoals dopamine, epinefrine, norepinefrine, GABA en serotonine, en belangrijke metaboliëten die betrokken zijn bij specifieke routes die in verband worden gebracht met PD, zoals de ureumcyclus, en het polyamine- en tyrosinemetabolisme.

De integratie van omics gegevens in een model kan het begrip van het mechanisme en de functie achter complexe neurologische aandoeningen aanzienlijk verbeteren. **Hoofdstuk 5** introduceert *iNESC2DN*, een gevalideerd constraint-gebaseerd metabool model in menselijke dopaminerge neuronen, ontworpen om het begrip van PD te bevorderen. We hebben multi-omics analyses uitgevoerd op iPSC-afgeleide, humane neuroepitheliale stamcellen (hNESC), gedifferentieerd tot midbrain-specifieke dopaminerge neuronen en de verkregen data geïntegreerd in een genom-schaal constraint-based reconstructie en analyse model dat zich richt op het

generieke humane metabooloom, *Recon3D*, als basis om een stoichiometrisch en flux consistent constraint-based model van dopaminerge neuron metabolisme te genereren. AccQ-Tag derivatisering (RPLC-MS) en GC-MS werden toegepast om het centrale koolstof- en energiemetabolisme te beoordelen, en het neurochemische profiel vast te leggen. Bovendien kon GC-MS ingezet worden voor de kwantificatie van suikers. Handmatige literatuur curatie, transcriptomics en de metabolomics input werden gebruikt om het metabolisme te beperken.

Het laatste stukje in de puzzel van het begrijpen van ziekten kan in het metabooloom liggen. We ontwikkelden en valideerden een nieuwe derivatiseringstechniek die de potentie heeft om meer dan 90% van het menselijk metabooloom absoluut te kwantificeren. In dit proefschrift maken we gebruik van gerichte LC-MS/MS benaderingen en dit beperkt de metabole dekking die nodig is om het menselijk metabolisme echt samen te stellen. Op basis van de gegevens gepresenteerd in dit proefschrift, kan de ontwikkelde methodologie verder worden uitgebreid voor ongerichte derivatisering en indien gekoppeld aan gevoelige analytische apparatuur (dat wil zeggen, nanospray ESI-MS) dan liggen de mogelijkheden voor single-cell metabolomics binnen handbereik.

Met dit proefschrift hebben we de toepasbaarheid aangetoond van systeembioïologie om het begrip van PD te vergroten. We moeten van modellen met één compartiment overgaan op modellen met meerdere matrices/organen om het hele plaatje van een organisme te kunnen vormen. Succesvolle uitvoering van orgaan- of multi-orgaan metabolische modellen zal het begrip van PD vergroten; dit sluit aan bij de associatie van de ziekte met de metabolische veranderingen die niet alleen in de substantia nigra, maar ook in andere hersengebieden worden vertoond. Dit is sterk afhankelijk van de toegang tot nauwkeurige en reproduceerbare omics-gegevens, en de mogelijkheid om bias te verwijderen die wordt veroorzaakt door gegevens die zijn verkregen uit experimenten die geen realistische weergave zijn van het menselijk metabooloom, waaronder kwesties zoals onnauwkeurigheid in hersengebied cellijn associatie en cel levenscyclus fase, variabiliteit in co-cultuur cellijn expressie en het kweken van cellen in een kunstmatige omgeving. In onze studie hebben we ons gericht op dopaminerge neuronen in de substantia nigra. Verdere toekomstperspectieven van deze computationele modellen zijn de mogelijkheid om de oorzakelijke factoren van PD en andere complexe neurologische ziekten te

## Addendum

onderzoeken, en potentiële therapeutische doelen aan te wijzen. De combinatie van celmodellen, metingen van hoge kwaliteit, een reeks referentiewaarden in diermodellen en computationele modellering zou de kloof kunnen overbruggen in de richting van gepersonaliseerde geneesmiddelen.