



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Functions of leptin in tuberculosis and diabetes: multi-omics studies across species

Ding, Y.

### Citation

Ding, Y. (2021, December 7). *Functions of leptin in tuberculosis and diabetes: multi-omics studies across species*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3245305>

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/1887/3245305>

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

## Nederlandse samenvatting

**Hoofdstuk 1** geeft een algemene achtergrond van het metabool wasting-syndroom (ook wel cachexie genoemd), functies van het leptine-gen en de belangrijkste omics-technologieën en een overzicht van dit proefschrift. We richten ons met name op twee ziekten die in een later stadium tot cachexie leiden: tuberculose (TB) en diabetes mellitus (DM). TB blijft een grote bedreiging voor de wereldwijde volksgezondheid en een van de belangrijkste middelen om de ziekte onder controle te houden, is het ontwikkelen van nieuwe efficiënte, reproduceerbare en kosteneffectieve diagnostische methoden. Hier laten we zien dat op omics gebaseerde benaderingen veelbelovend zijn voor de ontdekking van tbc met biomarkers en voor het voorspellen van de uitkomst van de therapie. DM is een chronische stofwisselingsziekte die wordt veroorzaakt door defecten in de insuline signalering. Leptine is uitgebreid bestudeerd bij diabetes vanwege zijn cruciale rol bij de regulatie van het lichaamsgewicht, de energiehomeostase en het metabolisme. Leptine is ook geïmpliceerd om een rol te spelen bij de progressie van tuberculose. We illustreren dat de zebra vis een veelzijdig diermodel is om de progressie en de pathogene mechanismen van TB en DM en functies van leptine in het wasting-syndroom te bestuderen. Verder vergelijken we de sterke en zwakke punten van de meest gebruikte analytische instrumenten: massaspectrometrie en nucleaire magnetische resonantie. We vatten ook de momenteel meest voorkomende short-reading RNAseq-methoden samen en de toekomstige mogelijkheden voor het omvangrijke gebruik van long-reading sequencing methoden.

Tuberculose is een zeer besmettelijke en mogelijk dodelijke ziekte die gepaard gaat met slopende symptomen, die ernstige metabole veranderingen veroorzaken bij geïnfecteerde mensen. Metingen van metabolieten bij menselijke tbc-patiënten is een veelbelovende methode gebleken voor diagnostische doeleinden. In **Hoofdstuk 2** hebben we het effect van mycobacteriële infectie op het niveau van metabolieten in het bloed van mensen en muizen en hele zebra vislarven vergeleken met behulp van één zeer gestandaardiseerde massaspectrometrie pijplijn, waardoor technische vergelijkbaarheid van de resultaten is gegarandeerd. Kwantificering van een reeks circulerende kleine amines toonde aan dat de niveaus van de meeste van deze verbindingen significant waren verlaagd in alle drie de groepen geïnfecteerde organismen. Onze studie identificeerde 10 algemene biomarkers voor tuberculoseziekte bij mensen, muizen en zebra vis, waaronder: methionine, asparagine, cysteïne, threonine, serine, tryptofaan, leucine, citrulline, ethanolamine en fenylalanine. Verder hebben we het zebra vismodel gebruikt om de metabolische veranderingen na infectie verder te onderzoeken met behulp van NMR-analyses op basis van een groot aantal exemplaren. De NMR-analyse van zebra vislarven bevestigde de MS-gegevens en identificeerde ook nieuwe markers voor infectie, waaronder het identificeren van algemene effecten op het metabolisme, zoals een verandering van glucosespiegels. Onze resultaten laten het behoud van metabole herprogrammeringsprocessen tussen soorten zien tijdens tbc-infectie en ziekte bij mensen, muizen en zebra vis. Blijkbaar zijn de mechanismen die ten grondslag liggen aan deze processen

onafhankelijk van omgevings-, ontwikkelings- en gewervelde evolutionaire factoren. Het zebravislarvenmodel is zeer geschikt om het mechanisme van metabole herprogramming en het verband met het wasting-syndroom door infectie door mycobacteriën verder te onderzoeken.

Leptine is een hormoon dat functioneert bij de regulatie van energiehomeostase via onderdrukking van de eetlust. In de zebravis zijn er twee paraloge genen die coderen voor leptine, genaamd *lepa* en *lepb*. In een genexpressiestudie ontdekten we dat het *lepb*-gen significant gedownreguleerd was onder de staat van insulineresistentie in zebravislarven, wat suggereert dat de *lepb* een rol speelt bij glucosehomeostase. In **Hoofdstuk 3** hebben we *lepb*-deficiënte zebravissen gegenereerd met behulp van de CRISPR/CAS9-genediting-aanpak. Deze studie heeft tot doel te onderzoeken of de verstoring van het *lepb*-gen zou resulteren in de ontwikkeling van type 2 diabetes mellitus (T2DM) en diabetische complicaties T2DM bij volwassen zebravissen. Om deze vraag te beantwoorden, onderzochten we het lichaamsgewicht en de lengte, de bloedglucosepiegels en de verdeling van lichaamsvet bij 1,5 jaar oude *lepb*<sup>-/-</sup> volwassen zebravissen en vergeleken ze met WT-controles van dezelfde leeftijd. Verder onderzochten we de renale histopathologische veranderingen van deze zebravissen door hematoxyline en eosine (HE) of Periodic acid Schiff (PAS) kleuring en transmissie-elektronenmicroscopie (TEM) methoden uit te voeren. We hebben waargenomen dat *lepb*<sup>-/-</sup> volwassen zebravissen een toename in lichaamsgewicht, lengte en viscerale vetophoping hadden, in vergelijking met leeftijd-gematchte controle zebravissen. Bovendien had de *lepb*<sup>-/-</sup>-zebravis significant hogere bloedglucosewaarden in vergelijking met controle-zebravissen. Deze gegevens geven gezamenlijk aan dat *lepb*<sup>-/-</sup> volwassen zebravissen de kenmerken van T2DM vertonen. Verder toonden we aan dat *lepb*<sup>-/-</sup> volwassen zebravissen glomerulaire hypertrofie en verdikking van het glomerulaire basale membraan hadden, in vergelijking met controle zebravissen, wat suggereert dat *lepb*<sup>-/-</sup> volwassen zebravissen vroege tekenen van diabetische nefropathie ontwikkelen. Concluderend tonen onze resultaten aan dat *lepb* glucosehomeostase en adipositas bij zebravissen reguleert, en suggereren ze dat *lepb*<sup>-/-</sup> mutante zebravissen een veelbelovend model zijn om de rol van leptine in de ontwikkeling van T2DM te onderzoeken en dat ze een aantrekkelijk model zijn om mechanistisch en therapeutisch onderzoek in T2DM en de complicaties ervan uit te voeren.

Leptine speelt een cruciale rol bij de regulatie van metabole homeostase. Het moleculaire mechanisme en de cross-talks tussen leptine en metabole routes die leiden tot metabole homeostase bij verschillende soorten zijn echter niet duidelijk. In **Hoofdstuk 4** hebben we de metabole veranderingen vergeleken die het gevolg zijn van leptine-deficiëntie in het bloed van volwassen ob/ob-muizen en geëxtraheerde en intacte zebravislarven met behulp van MS, NMR in oplossingstoestand en NMR met hoge resolutie magic-angle spinning (HR-MAS NMR) spectrometrie. Daarnaast hebben we de transcriptomische veranderingen vergeleken die het gevolg zijn van leptine-deficiëntie in ob/ob-muizenkoppen, een gepubliceerde dataset voor ob/ob-muizenlever en *lepb*-mutante zebravislarven met behulp van deep RNA-sequencing (RNA-seq). Dertien metabolieten werden geïdentificeerd als algemene biomarkers die ob/ob-muizen en *lepb*<sup>-/-</sup>

zebravislarven onderscheiden van hun respectievelijke wildtype-controles: alanine, citrulline, ethanolamine, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, methionine, fenylalanine, putrescine, serine en threonine. Bovendien hebben we ook waargenomen dat glucose- en lipideniveaus verhoogd waren in *lepb*<sup>-/-</sup> zebravislarven in vergelijking met de *lepb*<sup>+/+</sup> groep. RNAseq toonde aan dat veel genen die betrokken zijn bij proteolyse en arachidonzuurmetabolisme ontregeld waren in respectievelijk ob/ob-muizenkoppes en *lepb*-mutante zebravislarven in vergelijking met hun wildtype-controles. Leptine-deficiëntie bij volwassen muizen en larvale zebrevissen leidt tot zeer vergelijkbare metabole veranderingen in aminozuurniveaus. Deze metabole veranderingen vertonen dezelfde hoofdkenmerken als waargenomen tijdens de progressie van tuberculose bij menselijke patiënten, knaagdieren en zebravislarven. Bovendien vonden we, door het transcriptoom te bestuderen, zeer vergelijkbare veranderingen in genregulatie gerelateerd aan proteolyse en arachidonzuurroutes in deze twee testsystemen. Deze resultaten laten een opmerkelijke overeenkomst zien tussen de effecten van leptine-knockdown op de metabolomen en transcriptomen van volwassen muizen en zebravislarven die mogelijk verband houden met het wasting-syndroom. Blijkbaar is de metabole controle door leptine vergelijkbaar in respectievelijk volwassen en embryonale stadia bij zoogdieren en vissen.

Leptine speelt een evolutionair geconserveerde rol bij het reguleren van glucosehomeostase en systeemmetabolisme, evenals cellulaire en systemische ontstekingsreacties. In overeenstemming hiermee speelt het leptine-gen een rol bij veel ziekten zoals kanker, tuberculose en diabetes. In **Hoofdstuk 5** onderzochten we het metabolisme van een leptinemutant in de aan- en afwezigheid van mycobacteriële infectie in muizen en zebravislarven. Metabolieten in het bloed van *ob/ob*-muizen en volledige *lepb*-mutante zebravislarven werden bestudeerd met respectievelijk massaspectrometrie en HR-MAS NMR-spectrometrie. Onze resultaten laten zien dat leptine mutaties en mycobacteriële infectie leiden tot een vergelijkbaar metabool syndroom, gekenmerkt door de afname van 11 aminemetabolieten. Bij beide soorten werd dit metabool syndroom niet verergerd wanneer de leptinemutant werd geïnfecteerd door mycobacteriën. Daarom concluderen we dat leptine en mycobacteriële infectie beide het metabolisme niet-synergetisch beïnvloeden. Daaropvolgende transcriptoom studies in zebravislarven toonden aan dat mycobacteriën een zeer duidelijke transcriptoom signatuur induceerden in de leptinemutant in vergelijking met de wildtype broer of zus-controle. Blijkbaar kunnen verschillende transcriptomische reacties leiden tot dezelfde metabole eindtoestanden. Daarom concluderen we dat leptine en mycobacteriële infectie het metabolisme op verschillende manieren beheersen, ondanks gedeelde metabole kenmerken.

In **Hoofdstuk 6** bespreken we de belangrijkste bevindingen beschreven in de voorgaande hoofdstukken van dit proefschrift en presenteren we perspectieven voor toekomstig onderzoek. We tonen aan dat zebrevissen een uitstekend diermodel zijn voor studies van metabole ziekten, waaronder tuberculose en diabetes vanwege verschillende specifieke voordelen. De effecten van *lep*- of *lep*-mutatie op obesitas bij zebrevissen, zoals gerapporteerd door verschillende

onderzoeksgroepen, zijn controversieel. We veronderstellen dat verschillen in fokschema's en compenserende genetische mechanismen verantwoordelijk kunnen zijn voor de gerapporteerde inconsistenties. Vervolgens bespreken we dat de metabole veranderingen in leptinemutanten en infectieziekten die in dit proefschrift worden beschreven, in hoge mate geconserveerd zijn in verscheidene diersoorten en verschillende ontwikkelingsstadia, rekening houdend met de volgende punten. Ten eerste zijn metabole veranderingen als gevolg van mycobacteriële infectie sterk vergelijkbaar in mensen, muizen en zebra-*vis* larven. Ten tweede lijken metabole en transcriptomische veranderingen als gevolg van leptine mutatie erg op elkaar bij muizen en zebra-*vis* larven. Ten derde lijken metabole veranderingen als gevolg van mycobacteriële infectie en leptine mutatie sterk op elkaar bij muizen en zebra-*vis* larven. Ten vierde is aangetoond dat metabole veranderingen zeer vergelijkbaar zijn op basis van verschillende monstervoorbereiding en metabolomics-technologieën: massaspectrometrie en nucleaire magnetische resonantiespectroscopie. Verder bespreken we de rol van leptine bij tuberculose en het potentiële nut van leptine-deficiënte zebra-*vis*sen voor studies naar zwangerschapsdiabetes mellitus en lopend werk dat momenteel wordt uitgevoerd. Ten slotte bieden we perspectieven van 3 aanvullende technologieën voor toekomstige studies van nieuwe onderzoeksvragen die voortvloeien uit deze studie. (1) Potentiële toepassingen van een methode genaamd positionele isotopomeer nucleaire magnetische resonantie tracer analyse (PINTA) en magnetische resonantie microimaging ( $\mu$ MRI) worden voorgesteld voor verder onderzoek bij zebra-*vis*sen. (2) Een geautomatiseerde screeningstechnologie (VAST) bioimager-platform voor gewervelde dieren zal worden toegepast voor high-throughput-metingen van spieraafbraak tijdens de ontwikkeling in met mycobacteriële geïnfecteerde wildtype en leptine-mutante zebra-*vis* larven. (3) Een gevoelig HPLC-MS/MS-platform voor gerichte analyse kan worden gebruikt voor studies van vetzuren, met name derivaten van de arachidonzuursignaleringsroute. Door deze geavanceerde platforms te gebruiken, willen we nieuwe inzichten bieden in de mechanismen van metabole veranderingen die ten grondslag liggen aan tuberculose en diabetes.

