



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The molecular basis of metabolic syndrome: studies in zebrafish**

Nowik, N.

### **Citation**

Nowik, N. (2022, March 30). *The molecular basis of metabolic syndrome: studies in zebrafish*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3281256>

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/1887/3281256>

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

## SAMENVATTING

Tuberculose (tbc) is momenteel één van de meest dodelijke infectieziektes ter wereld en blijft, als een van de tien belangrijkste doodsoorzaken, een grote bedreiging voor de volksgezondheid wereldwijd. Hoewel *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), de ziekteverwekker die tuberculose veroorzaakt, al vele jaren bekend is, is de uitroeiing ervan tot dusver niet gelukt. Een golf van multi drug resistente (MDR) en extreme drug resistente (XDR) stammen van de ziekteverwekker vereist alternatieve vormen van therapieën tegen de ziekte ter ondersteuning van de huidige behandeling. Complexiteit van interactiemechanismen tussen gastheer en ziekteverwekker en metabole aanpassing tijdens het ziekteverloop spelen een belangrijke rol bij het bepalen van de uitkomst van de bacteriële infectie. Deze complexe mechanismen vereisen een bredere benadering van een nieuwe anti-tbc-therapie, bijvoorbeeld door de natuurlijke weerstand van de gastheer te verhogen. Vanwege de gecompliceerde aard van tbc-infectie, richtte het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven zich op verschillende aspecten van insulineresistentie en glucosemetabolisme tijdens de infectie. We gebruikten het zebrawislarvenmodel dat verschillende voordelen heeft voor het modelleren van aandoeningen en het mogelijk maakt om de functie van het aangeboren immuunsysteem los van het adaptieve immuunsysteem te bestuderen. De transparantie, snelle ontwikkeling en mogelijkheid tot genetische manipulatie maken zebrawislarven perfecte modelorganismen voor ons onderzoek.

Eiwittyrosinefosfatasen (PTP's) zijn factoren die een belangrijke rol spelen bij veel cellulaire processen zoals celoverleving, migratie en immuunresponsen. Er zijn vier klassen waarvan klasse I de grootste groep is die niet-receptor-PTP's bevat. Het eiwit tyrosinefosfatase non-receptor type 6 (*PTPN6*) gen komt voornamelijk tot expressie in het hematopoëtische systeem, maar expressie is ook waargenomen in epitheelcellen. Het product van dit gen, SHP-1, speelt een rol in veel verschillende signaalroutes. Het is een belangrijke regulator van myeloïde cellen, cytokinereceptoren, groeifactorreceptoren en immunoreceptoren. *ptpn6* knockdown bij zebrawissen leidt tot immuunsuppressie, ernstig oedeem en huidlaesies, vergelijkbaar met de bevindingen in muizen *Ptpn6*-mutanten *me*, *mev* en *spin*.

In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift vergeleken we de effecten van *ptpn6* morfolino knockdown en de kleine molecule Shp-1 remmer NSC-87877 waarvan eerder was aangetoond dat het humaan SHP-1 in vitro remt. Beide methoden werden gebruikt op zebrawisembryo's die waren geïnfecteerd met *Mycobacterium marinum* (Mm), een naaste verwant van Mtb. De resultaten van deze studie toonden aan dat verminderde SHP-1-activiteit het vermogen van zebrawisembryo's om de mycobacteriële infectie onder controle te houden, schaadt. Bovendien was de progressie van infectie sneller na zowel morfolino- als NSC-87877-behandeling in vergelijking met de controlebehandeling, waarbij dit effect ernstiger was na de knockdown van *ptpn6* morfolino dan na de remming van NSC-87877. Dit verschil kan worden veroorzaakt door remming van het verwante eiwitfosfatase *Ptpn11* door NSC-87877,

aangezien dit fosfatase in muizencellen een negatieve rol speelt bij celoverleving tijdens ontsteking en apoptose versnelt door defosforylering van STAT5. Bovendien werd RNA-sequencing (RNAseq)-analyse uitgevoerd met behulp van RNA geïsoleerd uit hele geïnfekteerde larven. Deze analyse toonde aan dat verminderde SHP-1-activiteit resulteert in significante veranderingen in de expressieniveaus van genen die betrokken zijn bij processen zoals synaptische transmissie, ionentransport, celstructuur, proteolyse, de immuunrespons, apoptose en gonadotropinesecretie. Het is vermeldenswaard dat zowel de remming door NSC-87877 als de knockdown van *ptpn6* morfolino resulteerde in opregulatie van immuungerelateerde genen. Toch werden er enkele verschillen tussen de twee behandelingen gevonden. De knockdown van *ptpn6* morfolino had meer invloed op de expressie van metabole genen dan remming door NSC-87877. Bovendien werd de expressie van een groot aantal infectie-gereguleerde genen niet beïnvloed door de morfolino- of de remmerbehandeling. Deze gegevens laten zien dat beide methoden voor het remmen van de SHP-1 functie het verloop van de mycobacteriële infectie veranderen. Bovendien vormt de set genen die dezelfde transcriptionele respons vertoonden op de morfolino- en de remmerbehandeling een bruikbare referentieset die specifiek kan worden gekoppeld aan de functie van SHP-1 en ondersteunt verder onderzoek naar de NSC-87877 in vergelijking met andere SHP-1 remmers.

Leptine is een eiwit dat zowel als een pleiotroop hormoon als een cytokine werkt. Als hormoon reguleert het de energiehomeostase, voedselinname, insulinesecretie, angiogenese, botvorming en reproductie. Mutaties die functionele leptinedeficiëntie bij mensen veroorzaken, zijn zeldzaam en kunnen worden behandeld met leptinesuppletie, maar als ze niet worden behandeld, kunnen ze ernstige obesitas, insulineresistentie en overlijden veroorzaken. Bij muizen leiden mutaties in het gen dat codeert voor leptine of de leptinereceptor (*Lep* of *Lepr*) tot meerdere metabole veranderingen, resulterend in ernstige obesitas en insulineresistentie. Deze muizen zijn met name ook vatbaarder voor tuberculose, wat op zijn beurt leidt tot verhoogde leptinespiegels in de longen, die hun hoogste punt twee weken na infectie bereiken. Bovendien werd een verhoogde bacteriële aanwezigheid gevonden in de longen van geïnfekteerde muizen met een mutatie in het *Lep*-gen (*ob/ob* muizen), wat gepaard ging met een significant hogere mortaliteit.

In **Hoofdstuk 3** hebben we de rol van het *lepb* gen als immuunmodulator onderzocht door het opzetten van een zebrawislarvaal modelsysteem om het effect van leptinedeficiëntie op tbc-infectie te bestuderen. Het genoom van de zebrawis bevat twee leptine-genen: leptine a (*lepa*) en leptine b (*lepb*). Hoewel de twee eiwitten slechts 24% van hun aminozuren gemeen hebben en slechts 18% identiek zijn aan humaan leptine, delen ze een karakteristieke genstructuur en functie met hun zoogdierorthologen. De twee leptine genen komen differentieel tot expressie: bij volwassenen komt *lepa* voornamelijk tot expressie in de lever, terwijl *lepb* tot expressie wordt gebracht in de eierstokken. Eerdere studies toonden een hoge inductie van de expressie van het *lepb*-gen in larvale zebrawissen tijdens bacteriële infectie

met *Staphylococcus epidermidis* en *Mm*, evenals een sterke opregulatie na *ptpn6* knockdown. Met behulp van morfolino knockdown en een CRISPR/Cas9-gegenereerde mutante vislijn, bestudeerden we het effect van leptine-signalering in *Mm* geïnficeerde zebrafisembryo's. Morfolino onderzoeken toonden aan dat knockdown van zowel *lepb* als *lepr* leidde tot een hogere mortaliteit en een sneller verloop van infectie. Aan de andere kant had knockdown van *lepa* geen significante invloed op het verloop van de infectie. We ontdekten dat het effect van de door CRISPR/Cas9 gegenereerde *lepb*-mutatie ernstiger was dan na de morfolino-knockdown, vooral na een dooierinfectie bij 4 hpf. Verder zagen we een lichte afname van het aantal macrofagen in de *lepb* mutant larven, terwijl het aantal neutrofielen niet was veranderd. In de *lepb* mutant werd de expressie van twee pro-inflammatoire genen, *irg1l* en *il1b*, na de infectie gedownreguleerd. Injectie van een humaan recombinant leptine eiwit redde echter gedeeltelijk het fenotype van de geïnficeerde *lepb*-mutante larven: de bacteriële belasting in de geïnficeerde leptine-mutant nam af en de *irg1l* expressie nam toe. Bij muizen is ook aangetoond dat leptine de expressie van *il1b* reguleert, en de deficiëntie ervan leidt tot immunosuppressie en downregulatie van pro-inflammatoire cytokines en markers. Daarnaast hebben we getest hoe glucosespiegels veranderen tijdens mycobacteriële infectie in wildtype en *lepb* mutant zebrafislarven. We ontdekten dat na *Mm* infectie de glucoseconcentratie significant was verhoogd in wildtype embryo's, terwijl *lepb*-mutante larven zowel voor als na de infectie veel hogere glucosespiegels vertoonden. Alles bij elkaar genomen geven onze resultaten aan dat het leptine eiwit een belangrijke rol speelt in de afweer van de gastheer tijdens de vroege stadia van een mycobacteriële infectie, wat de rol van leptine in de immuunafweer tegen tbc onderstreept. Deze resultaten ondersteunen ook een verdere verkenning van de mogelijkheden voor de ontwikkeling van nieuwe gastheergerichte behandelmethoden tegen tbc.

Zoals hierboven vermeld, is leptine ook uitgebreid bestudeerd bij obesitas en diabetes mellitus type 2 (DM2), omdat het aangetoond is dat het een leidende rol speelt in de energiehomeostase van het hele lichaam. De moleculaire mechanismen waarmee leptine de insulineresistentie regelt, zijn echter grotendeels onbekend. Er is onderzoek gedaan naar insulineresistentie en DM2 op menselijke celculturen en in verschillende diermodellen, voornamelijk knaagdieren. De mutante muizenstammen van de leptine- en leptinereceptorgen, respectievelijk de *ob/ob*- en *db/db*-stammen, vertonen diabetische fenotypes en zijn daarom zeer nuttig voor diabetesonderzoek. Bovendien zijn vetrijke dieetmuizen, Zucker-vette ratten en Zucker-diabetische vette ratten op grote schaal gebruikt om DM2, obesitas en de functie van leptine signalering bij het metabool syndroom te bestuderen. Zebrafismodellen zijn gebruikt als alternatieve testsystemen voor het bestuderen van insulineresistentie en DM2 omdat ze meerdere mogelijkheden bieden om metabole ziekten te onderzoeken, met behulp van talrijke transgene en knockoutlijnen. Bij volwassen zebrafissen spelen de leptine en de leptinereceptor een behouden rol in de glucosehomeostase, maar ze hebben geen invloed op het vetweefsel. Hoewel er al diabetesmodellen bestaan bij volwassen zebrafissen, is er vraag naar een alternatief

larvalemodel in een vroeg stadium, dat het mogelijk zou maken om snelle en grootschalige screeningsassays uit te voeren. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat zebravislarven een veelbelovend modelsysteem vormen om DM2 te bestuderen onder niet-voedende omstandigheden. Shp-1 werkt, zoals eerder vermeld, als een negatieve immuunmodulator, maar het is ook een sleutelfactor in insulineresistentie.

We hebben de rol van leptine b en SHP-1 op insulineresistentie bij vroege zebravislarven geanalyseerd in **Hoofdstuk 4**, door een nieuwe high-throughput methode te ontwikkelen om antidiabetica te testen. De screening was mogelijk vanwege het feit dat leptine deficiënte zebravislarven volledig insulineresistent waren en al in een zeer vroeg stadium van hun ontwikkeling een diabetisch fenotype vertoonden. We toonden ook aan dat metformine, hoewel zeer effectief voor de behandeling van dit diabetische fenotype bij 4 dagen oude zebravislarven, geen antidiabetische effecten had in eerdere stadia van ontwikkeling. Deze bevinding gaf aan dat insulinerectoren functioneel zijn in de zeer vroege stadia van embryogenese, wat ook werd bevestigd toen we het effect bestudeerden van het injecteren van humane recombinante insuline in de dooierzak. Een van de zebravisgenen die coderen voor een insulinerceptor (*Insrb*) werd naar verluidt tot expressie gebracht in het 18-somietenstadium en beide insulinerceptorogenen werden door de moeder tot expressie gebracht in bevruchte eieren. Bovendien is beschreven dat twee insulinegenen tot expressie worden gebracht tijdens de vroege ontwikkeling van de zebravis. Het is aangetoond dat het *Insb*-gen tot expressie wordt gebracht bij prolifererende blastomeren 3 en 4 uur na de bevruchting. Helaas zijn er geen gegevens beschikbaar over welke glucosetransporters betrokken zouden kunnen zijn bij het transport van glucose tijdens de embryogenese. Met behulp van ons high-throughput testsysteem identificeerden we de chemische remmer NSC-87877 als een potentieel alternatief antidiabetisch medicijn dat in staat was om het diabetische fenotype van de *lepb*-mutant 3 dagen na de bevruchting en in eerdere stadia van ontwikkeling om te keren. We hebben vastgesteld dat Shp-1 het meest waarschijnlijke doelwit is dat verantwoordelijk is voor het antidiabetische effect van NSC-8787, aangezien het uitschakelen van genen die coderen voor andere mogelijke doelwitten van NSC-87877, *ptpn11a*, *ptpn11b* en *dusp26*, het *lepb*-mutante fenotype niet kon redden. Er is aangetoond dat NSC-87877 een sterker remmend effect heeft op het dubbele fosfatase DUSP26 dan op het menselijke SHP-1 eiwit. Het expressiepatroon van *dusp26* dat beperkt is tot neuro-endocriene weefsels in zebravislarven is in overeenstemming met de resultaten van onze reddingsexperimenten. Ten slotte hebben we de functie van leptine getest in *Xenopus laevis*, een van de weinige andere gewervelde modellen waarin embryo's gemakkelijk kunnen worden gemanipuleerd. We toonden aan dat in *X. laevis* embryo's twee leptine eiwitten een rol spelen bij het transport van glucose tijdens de embryogenese, wat erop wijst dat de functie van leptine bij het transport van glucose waarschijnlijk vertaalbaar is naar alle gewervelde dieren. Concluderend kan worden gesteld dat ons zebravismodel met hoge doorvoer het potentieel heeft om nieuwe antidiabetica te identificeren die verder kunnen worden getest in zoogdierstudies.

Patiënten die aan tuberculose lijden, ontwikkelen een toestand die verspillend syndroom of cachexie wordt genoemd en die wordt gekenmerkt door ernstige ondervoeding en aanzienlijk gewichtsverlies. Deze toestand kan leiden tot secundaire gezondheidsproblemen, zoals vermoeidheid, vertraagd lopen, een hoger risico op longembolie en secundaire longinfecties, die primaire doodsoorzaken zijn bij tbc patiënten. Glucocorticoïden zijn een klasse van steroïde geneesmiddelen, die analogen zijn van het endogene hormoon cortisol en die klinisch worden gebruikt als immuunonderdrukkende en ontstekingsremmende geneesmiddelen. Het is aangetoond dat glucocorticoïden, hoogstwaarschijnlijk als gevolg van hun vermogen om ontstekingsreacties te verzwakken, de overleving verbeteren van een subgroep van tbc-patiënten die lijden aan tuberculeuze meningitis en pericarditis. Bij longtuberculose wordt adjuvante behandeling met glucocorticoïden gebruikt om complicaties te voorkomen, maar het effect op de mortaliteit is niet duidelijk. Interessant is dat glucocorticoïden ook de symptomen van het wasting-syndroom bij tbc kunnen verminderen, maar de metabole effecten van glucocorticoïden bij tbc-patiënten zijn nog niet opgehelderd.

In **Hoofdstuk 5** hebben we het effect onderzocht van behandeling met glucocorticoïden in een zebravismodel voor tuberculose na *Mm* infectie. Onze resultaten toonden aan dat behandeling met het glucocorticoïde beclomethason resulteert in een hogere bacteriële belasting en een iets hogere mortaliteit. Interessant is dat behandeling met beclomethason de door infectie veroorzaakte metabole veranderingen remde. De *Mm* geïnduceerde stijging van de glucosespiegels werd teniet gedaan en de infectiegerelateerde afname van de spiermassa werd verminderd door de behandeling met beclomethason. Daarentegen had beclomethason geen effect op de spiermassa van de niet-geïnfecteerde larven. Beclomethason en infectie hebben hoogstwaarschijnlijk geen tegengestelde effecten op glucosespiegels en spiermassa, maar beclomethason moduleert de metabole respons van de larven tijdens de infectie. De waargenomen remming van de metabole effecten was niet te wijten aan het infectieniveau zelf, aangezien de bacteriële belasting in de met beclomethason behandelde larven juist was verhoogd. Transcriptoomanalyse door RNA-seq werd uitgevoerd om de moleculaire mechanismen te bestuderen die ten grondslag liggen aan deze veranderingen en de resultaten van deze analyse suggereren dat genen die betrokken zijn bij glucosemetabolisme, insuline en leptinesignalering een rol spelen in de waargenomen metabole veranderingen. Genontologie analyse onthulde dat veel immuun- en metabolisme-gerelateerde genen significant veranderd zijn na behandeling met beclomethason. De meeste van de gedownreguleerde genen waren betrokken bij het glucosemetabolisme, leptinesignalering, insulineresistentie en de pathogenese van DM2. Opgereguleerde genen waren meer geassocieerd met andere metabolische processen, voornamelijk vetopslag en cholesterolmetabolisme, hoewel sommige van hen betrokken zijn bij insulinesignalering. Bovendien toonden deze gegevens aan dat tijdens de mycobacteriële infectie de larven in een staat van verminderde gevoeligheid voor glucocorticoïden verkeren, wat eerder in verband werd gebracht met TB en andere infectieuze of inflammatoire aandoeningen. Samengevat

laten onze gegevens zien dat zebravislarven een interessant modelsysteem vormen om de mogelijkheden voor aanvullende glucocorticoïde therapie te onderzoeken om de metabole status van patiënten te verbeteren. Bovendien vormen ze een nieuw model voor studies naar de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan resistentie tegen glucocorticoïden, een fenomeen dat het klinische gebruik van deze ontstekingsremmende geneesmiddelen ernstig beperkt.

Concluderend heeft het onderzoek beschreven in dit proefschrift, waarbij de zebravis als modelsysteem is gebruikt, nieuw licht geworpen op de ingewikkelde relatie tussen TB en DM2, in het bijzonder op de rol van leptine, SHP-1 en glucocorticoïden. Leptine speelt een belangrijke rol bij tbc infectie en heeft een enorme invloed op de insulinegevoeligheid van zebravislarven. Net als wat is waargenomen in het muizenmodel, verhoogde leptinedeficiëntie bij zebravissen de bacteriële belasting en mortaliteit tijdens de infectie, wat leidde tot hyperglykemie en de ontwikkeling van insulineresistentie. Bovendien werd aangetoond dat een nieuwe SHP-1/SHP-2-remmer, NSC-87877, een veelbelovend geneesmiddel tegen diabetes is dat kan worden gebruikt voor verder DM2-onderzoek, omdat het in staat is het fenotype van de leptine-deficiënte te redden. zebravis en om het transport van glucose naar de weefsels te herstellen. In tegenstelling tot metformine kan NSC-87877 in zeer vroege ontwikkelingsstadia werken en remt het de functie van SHP-1 en factoren die het glucosemetabolisme ondermijnen, terwijl het vooral bekend is dat metformine de insulinegevoeligheid verbetert. Bovendien vermindert de behandeling met het glucocorticoïde beclomethason de metabole veranderingen die gepaard gaan met de infectie, en transcriptieveranderingen die worden veroorzaakt door de behandeling met beclomethason suggereren dat genen die betrokken zijn bij het glucosemetabolisme, insuline en leptinesignalering allemaal een belangrijke rol spelen bij de modulatie van het metabolisme. Onze gegevens laten zien dat zebravislarven een interessant modelsysteem vormen om de complexe pathologie van TB te onderzoeken, en de studies beschreven in dit proefschrift waarin dit model is gebruikt, hebben nieuwe inzichten opgeleverd in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het cachexie metabool syndroom en de mogelijkheden voor adjuvante glucocorticoïde therapie om deze metabolische toestand te verlichten.

