



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Metabolomics assisted with stable-isotope labeling: exploring neuronal metabolism related to Parkinson's disease**

Huang, L.

### **Citation**

Huang, L. (2024, January 25). *Metabolomics assisted with stable-isotope labeling: exploring neuronal metabolism related to Parkinson's disease*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3715034>

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/1887/3715034>

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

## Samenvatting

De hoge prevalentie van neurodegeneratieve ziekten onder de oudere bevolking is een almaar zorgwekkender probleem geworden. Dit vormt voor zowel individuele gezinnen als de gehele maatschappij een gezondheids- en economische last. Mensen bij wie de ziekte van Parkinson is vastgesteld hebben de gebruikelijke gebreken in motorisch handelen, die in een later stadium gepaard kunnen gaan met ontwikkeling van cognitieve- en gedragsstoornissen. De huidige beschikbare medicatie voor de ziekte van Parkinson helpt bij de symptomatische verlichting, maar is ineffectief in het vertragen van de ziekte. Daarom kan inzicht in de pathogene mechanismen van de ziekte baanbrekend zijn bij de behandeling. Gelukkig wordt er op dit gebied enorm veel onderzoek verricht in een poging om het ziekteverloop van Parkinson te verhelderen. De ontwikkeling van -omics-technieken voor het vinden van biomarkers gerelateerd aan Parkinson voor diagnose, prognose en behandeling, zijn met name in het laatste decennium in een stroomversnelling geraakt.

Metabolomics (metaboolanalyse) verwijst naar de systematische analyse van kleine biochemische moleculen in organismen. Het analyseren van het metabolisme kan een ideaal uitgangspunt zijn voor het begrijpen of interpreteren van systematische regulatie dat onder invloed staat van upstream veranderingen op genetisch of enzymatisch niveau. Dit kan bereikt worden door diverse analytische technieken, waarbij veranderingen in de metabolietenpoel of metabole response gekwantificeerd worden. Massaspectrometrie (MS) gecombineerd met vloeistofchromatografie (LC) is de meest gebruikte techniek vanwege haar voordelen: goede robuustheid, hoge verwerkingscapaciteit, groot dynamisch bereik en relatief eenvoudige monstervoorbewerking. Door regelmatig vernieuwing in kolommateriaalchemie en instrumentatie zullen LC-MS methoden alsmaar dichterbij het uiteindelijke doel van metabolomics komen: het nauwkeurig identificeren en kwantificeren van alle aanwezige metabolieten in een specifiek biologisch monster. Metabolomics gecombineerd met stabiele isotopenlabels is onmisbaar bij het bestuderen van metabole flux door metabole routes en netwerken. De huidige LC-MS methoden voor het meten van gelabelde metabolieten hebben echter hun beperkingen in het volledig vastleggen van de gelabelde informatie met hoge efficiëntie en gevoeligheid. Bovendien wordt de verdere benutting van informatie uit de gelabelde metabolieten voor de fluxinterpretatie beschouwd als een zeer rekenintensief en tijdrovend proces.

In het licht van de bovengenoemde uitdagingen, is de ontwikkeling van een passende strategie voor het bestuderen van het metabole landschap in relatie tot de pathogenese van de ziekte van Parkinson het belangrijkste doel van dit proefschrift. De door ons voorgestelde analytische strategie om metabole activiteit vast te stellen omvat twee analytische methoden en één dataverwerkingslijn. Deze kunnen vervolgens toegepast worden op het bestuderen van neuronale

modellen van het mesencephalon voortkomend uit geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC) in toestand van gezondheid of tijdens de ziekte van Parkinson.

Analyse van het polaire metaboloom door middel van hydrofiele-interactievloeistofchromatografie (HILIC), die complementair is aan omgekeerde-fasevloeistofchromatografie (RPLC), is in populariteit gestegen dankzij de verbeterde chromatografische retentie en scheiding. Deze toepassing als routineplatform voor grootschalig klinisch breedvoerige metabolomics onderzoek wordt nog steeds onderschat vanwege een gebrek aan de systematische evaluatie van resolutie, reproduceerbaarheid, robuustheid, high-throughput en betrouwbaarheid van het resultaat. In **Hoofdstuk 2** hebben we richtlijnen opgesteld voor het systematisch beoordelen van het functioneren van hydrofiele-chromatografie kolommen voor breedvoerig bloedplasma metabolomics onderzoek. Deze evaluatie heeft betrekking op diverse eigenschappen van chromatografisch functioneren, waaronder, matrix effect, herhaalbaarheid van batch analyses en dekking van metabole kenmerken. Onze resultaten laten zien dat de ZIC-c HILIC-kolom met zwitterionische stationaire fase bij neutrale pH bruikbaar is voor een uitgebreide polaire metaboliet profilering vanwege de superieure prestaties voor verscheidene stofklassen. Bovendien zorgt het voor betere isomeerscheiding, goede herhaalbaarheid en hoge dekking van metabolieten. Deze beoordelingsprocedure kan selectief worden ingezet voor elke toekomstige test met een nieuwe HILIC-kolom of -biologische matrix. De ontwikkelde HILIC-MS-methode heeft een solide basis gevormd voor de analyse van doelgerichte polaire metabolieten in onze vervolgonderzoeken.

Om vervolgens metabole ontregeling te identificeren in humane iPSC afgeleide neuronale modellen onder individuele en gecombineerde invloed van Parkinson-gerelateerde genetische- en omgevingsfactoren, te weten PINK1 gen mutatie en rotenon blootstelling, hanteert **Hoofdstuk 3** meerdere doelgerichte metabolomics platformen. Deze platformen richten zich zowel op polaire metabolieten van het centrale koolstof- en acylcarnitinemetabolisme als op apolaire metabolieten van het meervoudig onverzadigde vetzuurmetabolisme. Bij deze uitgebreide analyse van metabolietniveaus is soortgelijke metabole ontregeling gevonden, veroorzaakt door rotenon en de PINK1 gen mutatie. Voorbeelden zijn onder andere falende energieproductie (vermindering van glucose, verzadigde vetzuren en vertakte keten aminozuren metabolisme), verstoorde redoxbalans (geblokkeerde oxidatie van NADH naar NAD<sup>+</sup>), evenals verschillende stoornissen van de citroenzuurcyclus, die allen leiden tot verminderde mitochondriale ademhaling. Bovendien vertoonden zowel de gemuteerde als de aan rotenon blootgestelde groepen oxidatieve schade, die relatief ernstiger was in de groep met rotenonblootstelling. Al met al wezen deze resultaten erop dat neuronen met een inherente PINK1 genmutatie gecombineerd met exogene rotenonstress zouden kunnen resulteren in een complexer neurodegeneratief metabolisme. Vervolgens hebben wij de metabole effecten van

NAD<sup>+</sup>-suppletie op neuronale modellen van de ziekte van Parkinson met PINK1 genmutaties en/of rotenonblootstelling geëvalueerd. Deze resultaten van de metabolomics toonden een beperkte werkzaamheid van de NAD<sup>+</sup>-behandeling wat betreft het verbeteren van rotenon-gerelateerde energietekorten en geen effect voor de PINK1-gemuteerde groep. In plaats daarvan bracht het een onverwachte ontregeling van meervoudig onverzadigde vetzuren in de joint-factor group. Over het geheel genomen biedt deze studie waardevolle inzichten en een diepgaand begrip voor de pathogenese van Parkinsonismen vanuit een metabolomics perspectief. Voor toekomstige studies bij PINK1 patiënten is het van wezenlijk belang om deze ontregelde metabolieten vroegtijdig als mogelijke diagnostische biomarkers te kunnen valideren met meerdere doelgerichte metabolomics platformen.

Vanwege het gebruik van stabiele isotopenlabels om metabole routes te traceren, zijn we in staat een extra laag van metabole regulering bloot te leggen in een dynamisch beeld. In navolging van de in **Hoofdstuk 3** ontdekte fluxregulatie van verstoorde metabole routes in het kader van neurodegeneratie, waar hoofdzakelijk is gekeken naar het centrale koolstofmetabolisme en de bijbehorende *de novo* nucleotidesynthese en glutathionmetaboliseroutes, stelden wij in **Hoofdstuk 4** een nieuwe analysemethode voor. Deze HILIC methode koppelt aan hoge resolutie meervoudige reactie monitoring (MRM<sup>HR</sup>) met Zeno-val, te weten HILIC-Zeno-MRM<sup>HR</sup>. Hiermee bereikten wij nauwkeurige en reproduceerbare massa-isotopoloogkwantificering voor intacte metabolieten en het bijbehorende gefragmenteerde deel (substructuur), met vooral hoge gevoeligheid in de MS<sup>2</sup> fragmentatiemodus met ingeschakelde Zeno-valpulsering. Daarnaast behield de HILIC-Zeno-MRM<sup>HR</sup> methode de relatie tussen gelabelde precursor- en fragmentionen. Dit hielp in het nauwkeurig onderscheiden van gelabelde isotopologen met verschillende labelposities. Vervolgens hebben wij deze methode toegepast op het bestuderen van een neuronaal model voor neurodegeneratie geïnduceerd door rotenon. Door de gegevens over isotopologen van intacte metabolieten en fragmentionen te interpreteren, valideerden wij eerst de reconstructie van de *de novo* glutathionsyntheseroute van neuronen in het mesencephalon aan de hand van voedingsbronnen met D-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose en L-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-glutamine isotopenlabels. Onder neuronale oxidatieve stress droeg verhoogde oxidatie van zowel de basale- als de *de novo* gesynthetiseerde glutathionpoel bij aan de ernstig verminderde antioxidatie capaciteit als gevolg van rotenonblootstelling. Voorts toonden wij aan dat de verminderde *de novo* glutathionsynthese gepaard ging met veranderde activiteit van verschillende sleutelenzymen van de glucose-afgeleide glutamaataanvoer en de glutathionsynthese. Het identificeren van belangrijke regulatoren van metabole flux, van falende energieproductie tot oxidatieve stress, heeft ons geholpen om de ziektemechanismen beter te begrijpen.

De identificatie van fluxregulering over gelokaliseerde metabole routes is voornamelijk een hypothesegestuurde benadering die gebruikt wordt voor karakterisatie van een specifiek

celmetabolisme. Een breedvoerige fenotypering van de metabole flux in het hele netwerk zou kunnen werken als een gegevensgestuurde aanpak voor vlotte identificatie van primaire fluxomleidingen onder ziekteomstandigheden die nieuwe hypothesen voortbrengen. Om dit doel te bereiken, introduceert **Hoofdstuk 5** een semi-geautomatiseerde lijn voor fluxberekeningen met tracer-metabolomics in modellering met atoomresolutie (fluxTrAM) in de technische softwareomgeving (MATrix LABoratory, MATLAB). Op basis van een in silico model op genoomschaal van dopaminerge neuronal stofwisseling (iDopaNeuroC) en verzamelde  $^{13}\text{C}$ -gelabelde metabolomics gegevens uit in vitro iPSC-afgeleide neuronen van het mesencephalon, genereerde fluxTrAM automatisch experimentele  $^{13}\text{C}$ -gelabelde massa isotopologen distributie (MID) gegevenssets van neuronen van het mesencephalon. Daaruit voortvloeiend genereerde fluxTrAM ook een chemo-informatica database van gestandaardiseerde en context specifieke metabolietstructuren en in-kaart-gebrachte atoomreacties voor het iDopaNeuroC model. Meerdere oplossingen voor de fluxproblematiek zouden kunnen worden geboden door middel van conventionele  $^{13}\text{C}$ -gebaseerde metabole fluxanalyse op een kleine netwerkschaal. Bijvoorbeeld de voorspelling van fluxklassificatie, fluxbalansanalyse, en entropische fluxbalansanalyse op genoomschaal zouden een oplossing kunnen bieden. Dankzij een uitgebreide analyse- en vergelijking van fluxberekeningen kon de status beter worden vastgesteld van de fluxdistributie verkregen uit ons iDopaNeuroC model. fluxTrAM draagt ook bij aan het standaardiseren van high-throughput analyse van metabole flux op genoomniveau. De oplossing voor de flux op genoomschaal biedt een rekenkundige voorspelling van algemene metabole fenotypes voor gezonde menselijke neuronen van het mesencephalon, terwijl de noodzaak onderstreept wordt van het bestuderen van PINK1-cellijnen. Een vergelijkende analyse tussen PINK1- en isogene controlecellijnen zal ons in de gelegenheid stellen om belangrijke metabole ontregeling te onderscheiden. Voorspelde fenotypes kunnen kruislings worden gevalideerd en geïnterpreteerd aan de hand van de experimentele waarnemingen in **Hoofdstuk 3**. Deze kunnen gezamenlijk een extensief inzicht in ziektemechanismen voortbrengen.

Kortom, dit proefschrift heeft een analytische strategie ontwikkeld voor het bestuderen van het metabole landschap dat relevant is voor de pathogenese van de ziekte van Parkinson. Het vaststellen van de veranderingen in de metabole flux en metabolietconcentraties geeft een uitgebreid overzicht van metabole activiteit en helpt met het beter begrijpen van de ziektemechanismen van Parkinson. Een meer verfijnde en overtuigende modelreconstructie kan bereikt worden door toevoeging van compartimentele metabolietmetingen bij modelanalyse op genoomniveau. Wij hopen dat de identificatie van potentiële ziektemarkers wordt bespoedigd door de gecombineerde experimentele en rekenkundige aanpak en uiteindelijk zal bijdragen aan gepersonaliseerde behandelingen voor patiënten met de ziekte van Parkinson.