



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Lipidomics study in liver metabolic diseases**

Singh, M.

### **Citation**

Singh, M. (2024, June 13). *Lipidomics study in liver metabolic diseases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3762800>

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/1887/3762800>

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

# **Appendix**

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

List of Publications

Acknowledgements

## **Samenvatting**

De lever – een van de grootste organen in het lichaam – heeft een cruciale rol bij het leveren van energie. De lever reguleert diverse metabole processen, zoals het afbreken van suikers en vetten, en is belangrijk bij het handhaven van homeostase in ons lichaam. Soms kunnen verstoringen in deze processen optreden door bijvoorbeeld genetische afwijkingen of omgevingsfactoren, wat tot leverziekten kan leiden. Vetten (lipiden) hebben een belangrijke rol in ons lichaam en de lever is, als het ware, het controlecentrum voor de verwerking ervan. Als de normale werking van de lever verstoord is, kan dit de lipidenniveaus in ons lichaam beïnvloeden, zoals beschreven in **hoofdstuk 1**. Hierdoor kan het bestuderen van lipiden (lipidomics) ons helpen begrijpen wat er gebeurt in het lichaam als er problemen zijn met de lever. Dit onderzoek gaat over de ontwikkeling van methoden om verschillende soorten lipiden te meten en het gebruik van deze methoden bij onderzoek naar leverziekten. Het eerste deel van dit proefschrift (**hoofdstuk 2 en 3**) was gericht op het ontwikkelen van methoden om lipiden te bestuderen en deze methode toe te passen op celmodellen. Het tweede deel (**hoofdstuk 4, 5 en 6**) richtte zich op een specifieke klasse lipide genaamd acyl-coënzym A (acyl-CoA), de rol van acyl-CoA in vetzuuroxidatiestoornissen (*fatty acid oxidation disorders*, FAOD, bepaalde leverziekten) en de uitdagingen die gepaard gaan met het meten van deze verbindingen. Er is een methode ontwikkeld om acyl-CoA's te meten en deze methode is toegepast om een specifiek type FAOD te bestuderen, genaamd midden-lang keten acyl-CoA dehydrogenase deficiëntie (*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*, MCADD).

In **hoofdstuk 2** richtten wij ons op de ontwikkeling en validatie van een methode om verschillende lipidenklassen te bestuderen. Dit is gedaan met behulp van een techniek genaamd hydrofiele interactie- vloeistofchromatografie-tandemmassaspectrometrie (HILIC-MS/MS). Deze methode stelt ons in staat om in het detail te kijken naar zowel polaire als apolaire lipiden, en meette 1200 verschillende lipiden in 19 (sub)klassen. Deze klassen omvatten categorieën zoals glycerolipiden, glycerofosfolipiden, sfingolipiden en sterolen. Er was hierbij rekening gehouden met verschillende factoren die potentieel tot meetfouten kunnen leiden. Na validatie van de methode door verscheidene testen, analyseerden wij monsters van COVID-19 patiënten om te bestuderen hoe de lipidensamenstelling verandert afhankelijk van de ernst van de ziekte. Er was nauwkeurige kwantificatie uitgevoerd met een gestandaardiseerde type bloedplasmamonster NIST SRM 1950. De lipidenconcentraties verkregen uit de NIST-bloedplasmamonsters met behulp van onze HILIC-MS/MS methode vertoonden goede overeenkomst met concentraties verkregen uit eerder onderzoek.

In **hoofdstuk 3** behandelden wij de zoektocht naar geschikte *in vitro* modellen die complexe functies van de lever accuraat nabootsten voor het onderzoek naar leverziekten. De gouden standaard voor zulke modellen is het gebruik van primaire humane hepatocyten (PHH). Echter, hebben deze cellen beperkingen zoals hun verlies van lever specifieke functies in de loop der tijd. Aldus hebben wij verschillende typen levercelmodellen vergeleken om te zien welke soortgelijke functies konden uitvoeren als PHH's, waaronder stamcelafgeleide hepatocyten (iPSC-Hep), humane hepatocellulaire carcinoomcellen (HepG2), geïmmortaliseerde upcyte-hepatocyten (Upcyte-Hep) en leverorganoïden van volwassen donoren. Wij hebben getest hoe deze cellen functioneerden onder normale voedingsomstandigheden en uitdagende omstandigheden (door het weglaten van glucose).

Tevens hadden wij de in **hoofdstuk 2** ontwikkelde analysemethode ingezet om de lipidsamenstelling van deze cellen te onderzoeken. We hadden vastgesteld dat PHH's onder uitdagende omstandigheden zowel binnen als buiten de cellen de hoogste glucoseproductie vertoonden. Leverorganoïden waren daaropvolgend wat betreft de glucoseproductie, en hun lipidsamenstelling was vergelijkbaar met die van PHH's. Andere celtypen, zoals iPSC-Hep en HepG2 vertoonden een lagere glucoseproductie. Er zijn veranderingen in sleutelenzymen gerelateerd aan glucoseproductie geobserveerd en tevens veranderingen in lipidenprofielen in uitdagende omstandigheden, wat verschillen suggereerden in hoe deze cel. De resultaten impliceren dat leverorganoïden een goed alternatief kunnen zijn voor PHH bij het bestuderen van leverziekten. Maar er is meer onderzoek nodig om te bevestigen dat zij daadwerkelijk representatief zijn voor volledig functionerende en volgroeide levercellen.

FAOD's vormen een groep metabole leveraandoeningen die ontstaat door tekorten aan enzymen of eiwitten die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van vetzuren, een essentieel proces voor het leveren van energie als de glucosespiegel laag is. Afhankelijk van het type FAOD hopen Acyl-CoA's en acylcarnitines zich op. Hoewel acyl-CoA's de primaire biomarkers voor FAOD's zijn, worden ze niet routinematig gebruikt voor diagnostisering, omdat de analyse ervan aanzienlijke technische uitdagingen met zich meebrengt. Acylcarnitines zijn afgeleiden van acyl-CoA's, die omgezet worden tijdens het vetzuurtransport naar de mitochondriën voor de vetzuuroxidatie. Acylcarnitines bewerkstelligen het transport van vetzuren over de mitochondriale membranen, waar zij uiteindelijk weer worden omgezet naar acyl-CoA's voor metabole processen. Omdat de analyse van acylcarnitines eenvoudiger is dan acyl-CoA's gebruiken ziekenhuizen bij voorkeur acylcarnitines voor de opsporing van FAOD's. **Hoofdstuk 4** geeft een uitgebreid overzicht van deze technische uitdagingen, recente

analytische voortuitgang bij de meting van acyl-CoA's en mogelijke maatregelen die genomen kunnen worden om de analyse te verbeteren. De voornaamste moeilijkheden bij de analyse van acyl-CoA's ontstaan door hun locatie binnenin de cel, de lage concentraties, instabiliteit en de uiteenlopende eigenschappen waarvoor meerdere scheidingsmethoden nodig zijn.

Om deze uitdagingen te overwinnen, hebben voorgaande onderzoeken verschillende technieken toegepast om acyl-CoA's uit biologische monsters te extraheren zoals, eiwitprecipitatie, vloeistof-vloeistof-extractie en vaste-fase-extractie. Er zijn verschillende methodes onderzocht voor de scheiding en detectie van deze verbindingen, waaronder enzymatische bepalingen, vloeistofchromatografie met ultravioletdetectie (LC-UV), gaschromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie (GC-MS) en vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC-MS). LC-MS is hiervan de gevoeligste en meest gebruikte methode. Recente inspanningen om de scheiding en detectie van acyl-CoA's te verbeteren, omvatten ionparen, derivatiseren en chemische ligatie. Het hoofdstuk benadrukt het belang van het gebruik van geschikte interne standaarden voor nauwkeurige kwantificatie. *Stable isotope labeling by essential nutrients in cell culture* (SILEC) is ontwikkeld om gelabelde isotopische standaarden voor acyl-CoA's te maken, die dienen als interne standaard voor nauwkeurige metingen. Dit is vooral cruciaal bij het kwantificeren van instabiele verbindingen zoals acyl-CoA's, aangezien zowel interne standaard als endogene varianten hetzelfde afbraakproces ondergaan. Samenvattend zette dit hoofdstuk recente vooruitgang uiteen in de analytische technieken voor het meten van acyl-CoA's en benadrukte het de noodzaak van verdere studies die gericht zijn op het vergroten van de stabiliteit en het vereenvoudigen van de analytische strategieën voor de meting van deze verbindingen.

In **Hoofdstuk 5** hadden wij één van de technische uitdagingen bij de analyse van acyl-CoA's aangepakt. Zoals vermeld in **hoofdstuk 4** hebben acyl-CoA's diverse eigenschappen, die vaak complexe chromatografische methoden of alternatieve technieken zoals ionparen of derivatisatie vereisen. Echter, gaan deze benaderingen gepaard met nadelen zoals verontreiniging en verhoogde complexiteit. In **hoofdstuk 5** was er een analysemethode ontwikkeld om het volledige scala aan acyl-CoA varianten in één enkele meting te dekken. Hierbij was een HILIC-MS/MS benadering met een zwitterionische ZIC-cHILIC kolom gebruikt. De ZIC-cHILIC kolom heeft zowel positief als negatief geladen deeltjes, wat leidt tot een zwakke elektrostatiche interactie met het analyt, in dit geval acyl-CoA's. De methode werd in eerste instantie ontwikkeld op een QTOF (quadrupole-time-of-flight) massaspectrometer om acyl-CoA varianten te identificeren en hun retentietijden te bepalen. Factoren als

bufferconcentratie, matrixeffecten door cellen en injectieoplosmiddelen werden in achtgenomen bij de optimalisatie van de chromatografie. Vervolgens werd een gerichte methode gecreëerd op een QTRAP (quadrupole ion trap) massaspectrometer. Deze methode omvatte succesvol vrij CoA en acyl-CoA's met korte tot lange ketens in één enkele meting. Het presteren van de methode werd geëvalueerd aan de hand van parameters zoals lineariteit, precisie, opbrengst en matrixeffect voor kwantificatie van acyl-CoA's in HepG2 cellen. Deze methode werd vervolgens toegepast om wildtype HepG2 cellen te bestuderen die gekweekt waren in zowel voedselrijke als voedselarme toestand. De resultaten toonden een toename in concentratie van korte-, middellange en lange keten acyl-CoA's en een afname van het vrije CoA-gehalte onder voedselarme toestand, wat duidt op activatie van het vetzuuroxidatie proces.

In **hoofdstuk 6** hadden we een grondig onderzoek uitgevoerd van *in silico*, *in vitro* en *in vivo* modellen. Dit was gedaan om het CoA-metabolisme en systemische veranderingen, veroorzaakt door een metabole leveraandoening genaamd MCADD, te begrijpen, en ook om mogelijke compensatiemechanismen te identificeren. Allereerst werd er een *in silico* (computer-)model van de menselijke lever ontwikkeld om de veranderingen in acyl-CoA's onder normale omstandigheden en MCADD-omstandigheden te analyseren. Dit model wees op een significante toename van bepaalde acyl-CoA's, met name C6-CoA en C8-CoA onder MCADD-omstandigheden, terwijl andere soorten, waaronder vrij CoA, afnamen. Deze *in silico* bevindingen werden bevestigd aan de hand van experimentele gegevens op basis van HepG2 celmodellen (*in vitro*), waarbij er verhoogde niveaus van middellange keten (C6-C10) acyl-CoA's en acylcarnitines waren onder MCADD-omstandigheden. Tevens was de invloed van MCADD op biosynthese van CoA onderzocht door cellen te behandelen met gelabeld pantotheenzuur (vitamine B5), een precursor van CoA. We zagen labelinbouw in vrij CoA tussen de wildtype- en MCADD-groep in dezelfde mate, wat duidt op een actieve biosynthese van CoA onder MCADD-omstandigheden. Verder ontdekten we tijdens *in vivo* experimenten met zowel gezonde (controle) muizen als MCADD-muizen, een significante toename in totale CoA-waarden bij de MCADD-muizen tijdens vasten en blootstelling aan kou. Genexpressieanalyse in monsters verkregen uit cellen en muizen toonde aan dat zowel enzymen van de CoA-biosynthese als de carnitine acyltransferasen in MCADD-toestand omhoog waren gereguleerd, wat suggereerde dat de beschikbare vrije CoA's kunnen worden uitgeput door de ophoping van middellange keten acyl-CoA's. Interessant genoeg waren ook de Acyl-CoA thioesterases (ACOT's), verantwoordelijk voor het aanvullen van de vrije CoA-pool en het verminderen van overtollige opbouw van acyl-CoA's, verhoogd, wat duidde op een

compensatiemechanisme. Verder ondersteunden *in silico*-experimenten het idee dat de gelijktijdige toename van totaal CoA en omhoog regulatie van ACOT's effectief de niveaus van vrije CoA's herstelden terwijl de giftige opbouw van C8-CoA werd verminderd. Dit wees op de activatie van meerdere compensatiemechanismen. Concluderend hebben wij een aanpak beschreven waarbij *in silico*, *in vitro* en *in vivo* technieken werden gecombineerd om bevindingen te valideren en systemische veranderingen bij MCADD te ontrafelen.

Over het algemeen genomen draagt het onderzoek beschreven in dit proefschrift bij aan begrip over hoe lipidomics onze kennis van metabole leverziekten kan vergroten. Wij hebben analytische technieken ontwikkeld om lipidenmoleculen uitgebreid te bestuderen en ze in verband te brengen met biochemische routes. Deze technieken zijn toegepast op verschillende *in vitro* modellen om inzicht te krijgen in de stofwisseling van de lever en om veranderingen van lipidensoorten te kwantificeren in de monsters van metabole leverziekten. In de toekomst biedt dit onderzoek mogelijkheden voor de integratie van lipidomics met biologische gegevens uit andere *-omics* onderzoeksvelden, een *multi-omics* benadering. Dit opent de weg naar een systeembioologische aanpak die de mogelijkheden van gepersonaliseerde geneeskunde kan verbreden.