



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Zebrafish as research model to study Gaucher disease: Insights into molecular mechanisms

Lelieveld, L.T.

Citation

Lelieveld, L. T. (2020, October 20). *Zebrafish as research model to study Gaucher disease: Insights into molecular mechanisms*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137851>

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/1887/137851>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137851> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Lelieveld, L.T.

Title: Zebrafish as research model to study Gaucher disease: Insights into molecular mechanisms

Issue date: 2020-10-20

Nederlandse samenvatting

Het voornaamste doel van het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, is het maken en karakteriseren van zebravis modellen om lysosomale stapelingsziekten te bestuderen, met in het bijzonder de ziekte van Gaucher. De ziekte van Gaucher wordt gekenmerkt door een defect in glucocerebrosidase (GCase), een enzym dat het lipide glucosylceramide (GlcCer) afbreekt in lysosomen. De zebravis is een aantrekkelijk model organisme voor onderzoeksdoelstellingen vanwege de kostenbesparende huisvesting en het vermogen om honderden nakomelingen te genereren. De nakomelingen, ook wel larven genoemd, zijn klein, transparent en hebben een snelle embryonale ontwikkeling ondergaan.

Zebravissen hebben een aantal specifieke kenmerken waardoor ze potentieel erg geschikt zijn om de ziekte van Gaucher te bestuderen: Ze produceren het lipide GlcCer, hun genoom heeft een ortholoog van het menselijke GBA gen en synthetiseert een actief β -glucosidase. Daarnaast komen ook twee interessante eiwitten tot expressie die de uitkomst van de ziekte mogelijk beïnvloeden: Het niet-lysosomale GBA2 en lysosomaal acid ceramidase (ACase).

Het onderzoek in dit proefschrift is voornamelijk gericht op het genereren van zebravissen met een deficiëntie van deze interessante (lysosomale) eiwitten, alsmede het optimaliseren en gebruiken van verschillende biochemische en genetische technieken om de katalytische kenmerken van GCase in de zebravis te bestuderen. Hiermee kunnen de gevolgen van deze deficiënties (of dubbel deficiënties) onderzocht worden bij jonge vissen (larven) en volwassenen. Ook is onderzocht wat de impact is van de GBA2 en ACase op het ziektebeeld van de GCase-deficiënte zebravissen.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de biologische functie, synthese en katabolisme van (glyco)sfingolipiden. Een defect in een van de enzymen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van deze lipiden leidt tot een groep erfelijke ziekten die lysosomale sfingolipide stapelingsziekten genoemd worden.

Drie van dergelijke stapelingsziekten staan centraal in dit proefschrift: De ziekte van Gaucher veroorzaakt door een deficiëntie in lysosomaal GCase, de ziekte van Fabry veroorzaakt door een deficiëntie in lysosomaal α -galactosidase A (α -GAL A) en de ziekte van Farber veroorzaakt door een deficiëntie in acid ceramidase (ACase). Vervolgens worden de aantrekkelijke kenmerken van de zebravis voor onderzoek naar genetische aandoeningen geïntroduceerd, gevolgd door reeds beschreven zebravis modellen voor verschillende lysosomale stapelingsziekten.

Het hoofdstuk eindigt met een overzicht van instrumenten en technieken, die thans veelal worden gebruikt om zebravis larven en volwassenen te bestuderen. Ook zijn er specifieke technieken beschikbaar om lysosomale glycosidases te bestuderen, zoals fluorogene substraten, activity-based probes (ABPs) en gevoelige LC-MS/MS technieken om afwijkende (glyco)sfingolipide hoeveelheden te meten.

In **hoofdstuk 2** wordt een combinatie van biochemische assays en moleculaire modellen gebruikt voor de bestudering en vergelijking van GCase enzymen van verschillende diersoorten, waaronder de mens, de zebravis, de kikker en de schildpad. Alle GCase enzymen vertoonden hydrolyse van het kunstmatige substraat 4-methylumbelliferyl β -glucoside (4MU- β -Glc) bij een zuur pH-optimum. Menselijk GCase vereiste saposine C of natriumtaurocholaat bij een pH van 5,2 voor optimale activiteit, terwijl GCase van de zebravis en kikker een optimale hydrolyse vertoonde bij pH 4,0 zonder deze toevoegingen. Verhoogde niveaus van endogeen GlcCer en het gedeacyleerde lipide, glucosylsingosine (GlcSph) werden gemeten in de GBA-deficiënte HEK293T-cellen en deze levels werden gecorrigeerd door expressie van elk van de GCase enzymen. Het enzym van de zebravis bleek, in schril contrast met de GCase van mens en kikker, niet in staat te zijn om de glucose van een 4MU- β -Glc of GlcCer donor over te dragen naar een cholesterol acceptor. Mogelijk past een cholesterol molecuul niet in de katalytische pocket van het zebravis GCase.

Vervolgens zijn *in silico* vergelijkingen uitgevoerd van de gepubliceerde 3D-structuur van het menselijke GCase met gemodelleerde structuren van de zebravis, kikker en schildpad enzymen. Hier kwam een hoge mate van algemene conservering naar voren inclusief conservering van de twee katalytische glutaminezuur residuen en andere residuen die deel uitmaken van de katalytische pocket. In deze *in silico* vergelijkingen bevinden zich afwijkende residuen in de drie flexibele loops van GCase die de katalytische pocket omringen. Drie specifieke residuen in het zebravis GCase leken potentieel interessant omdat hun hydrofobe zijgroepen mogelijk impact kunnen hebben op katalyse. Zebravis GCase enzymen met deze aminozuur veranderingen zijn vervolgens gemaakt en getest, maar deze enzymen vertoonden geen verbetering in transglucosylering. Om de hypothese verder te testen wordt overwogen om volledige loops te wisselen tussen de enzymen van verschillende diersoorten.

Hoofdstuk 3 beschrijft het gebruik van zebravissen als handig orgaanmodel om *in vivo* de doelgerichtheid van irreversibele GCase-remmers te bestuderen. De effectiviteit en selectiviteit van conduritol B-epoxide (CBE) en cyclophellitol (CP) werd geëvalueerd in ontwikkelende zebravislarven en vergeleken met bevindingen in gekweekte menselijke cellen. Alleen bij hoge CBE-concentraties werden niet-lysosomaal GBA2 en lysosomaal α -glucosidase geïdentificeerd als belangrijke off-targets, zowel in cellen als in zebravislarven. CP bleek GCase en GBA2 met dezelfde affiniteit te inactiveren en is daarom niet geschikt om modellen voor de ziekte van Gaucher te genereren. Nieuwe CP-derivaten, gefunctionaliseerd met een omvangrijke hydrofobe groep op de C8 positie, werden gevalideerd als krachtige en selectieve GCase remmers in gekweekte cellen en zebravislarven.

Hoofdstuk 3 toont bovendien dat het zebravis diermodel aantrekkelijke eigenschappen heeft voor het evalueren van de effectiviteit, specificiteit en biologische verspreiding van geneesmiddelen, in het bijzonder de permeabiliteit van de hersenen. De onderzoeken in hoofdstuk 2 en 3 demonstreren dat vergelijkbare fluorogene substraten, ABPs en LC-MS/MS technieken gebruikt kunnen worden in de zebravis om enzymkenmerken en relevante lipiden te evalueren als die voor menselijke- en muismaterialen.

Een praktisch voordeel van de zebravis, in vergelijking met de muis, is de snelheid en het gemak waarmee nieuwe genetische knockouts gegenereerd kunnen worden. **Hoofdstuk 4** biedt een gedetailleerd protocol voor het genereren van genetische knockouts in zebravissen door middel van CRISPR/Cas9 technologie. Het beschrijft ook de reeds gemaakte mutaties in de zebravis genen voor *Gba1*, *Gba2*, *Asah1a*, *Asah1b*, *Gpnmb*, *cln8* en *Npc1*. Analyses van RNA-expressie en (glyco)sfingolipide waarden van mutante larven van *Gpnmb*, *Cln8* en *Npc1*, bevestigen dat een functionele genetische knockout is gegenereerd. De impact van defecten in *Gba1*, *gba2*, *Asah1a* en/of *Asah1b* wordt in hoofdstuk 5-7 in detail beschreven.

Ook wordt in hoofdstuk 4 de Tol2-transposase techniek toegepast om een exogene DNA sequentie in het genoom van de zebravis te introduceren. Op die manier werd de coderende sequentie van menselijk *GBA* geïntroduceerd in de genetische achtergrond van de zebravis *gba1*^{-/-}. Dit menselijke GCCase was functioneel en leidde tot verlaging van GlcSph, beschreven in hoofdstuk 5. In een ander project werd de coderende sequentie van de zebravis prosaposine geïntroduceerd met een puntmutatie in het saposine C gebied, waarvan wordt gedacht dat het een disulfidebrug aantast.

De hoofdstukken 5 tot en met 7 rapporteren over GCCase-deficiënte “Gaucher” zebravissen. Het focust ook op de impact van een gelijktijdig defect in *GBA2* (hoofdstukken 5 en 7) of de impact van overmatig GlcSph (hoofdstuk 6).

Hoofdstuk 5 is gericht op de rol van zebravis *Gba2* in het glycosfingolipide metabolisme tijdens GCCase-deficiëntie. Zebravislarven met een GCCase- en/of *Gba2*-deficiëntie zijn gegenereerd door middel van genetische- of farmacologische inactivering. Vervolgens zijn de enzymstatus en de glycosfingolipide levels geëvalueerd van zebravislarven van 5 dagen oud (5 dagen na bevruchting, 5 dpf). De afwezigheid of inactivering van GCCase of *Gba2* is gevisualiseerd met behulp van specifieke ABPs, terwijl het GlcCer-metabolisme geanalyseerd is met behulp van gevoelige LC-MS/MS methoden.

Prominente vorming van GlcSph werd geconstateerd bij zowel de *gba1* en *gba1:gba2* genetische knockout larven als tijdens farmacologische inactivatie van GCCase in de zebravislarven. De accumulatie van GlcCer bij de GCCase-deficiënte vissen is relatief beperkt, waarschijnlijk vanwege het alternatieve metabolisme van het lipide tot GlcSph en de aanwezigheid van actief GCCase afkomstig van de heterozygote moeder. Significant hogere GlcCer- en lagere GlcChol waarden werden gemeten bij *Gba2*-deficiënte zebravis larven, wat het belang van *Gba2* voor de vorming van GlcChol weergeeft. Ook zijn iminosuikermers gebruikt om GlcCer-synthase en *Gba2* te remmen om zo de afwijkingen van het GlcCer metabolisme tijdens GCCase-deficiëntie te corrigeren. Over-expressie van humaan GCCase en injectie van recombinant GCCase zorgden beiden voor een correctie van de GlcSph waarden.

In **hoofdstuk 6** wordt de mogelijke toxiciteit van overmatig GlcSph tijdens GCase-deficiëntie onderzocht. Zebravissen hebben twee orthologen van humaan acid ceramidase (ACase): Asah1a en Asah1b. Een belangrijke observatie was de afwezigheid van GlcSph wanneer specifiek een Asah1b-deficiëntie werd geïntroduceerd, gelijktijdig met de GCase-deficiëntie. Ceramide accumulatie, zoals voorkomend bij de ziekte van Farber, werd alleen gedetecteerd wanneer zebravissen een gelijktijdige Asah1a- en Asah1b-deficiëntie hadden.

Een gedetailleerde vergelijking van *gba1* genetische knockout vissen, met overmatig GlcSph, en *gba1:asah1b* knockout zebravissen, zonder GlcSph, onthulde enkele morfologische en biochemische verschillen maar ook interessante overeenkomsten. Een significante verbetering van het fenotype werd waargenomen in de *gba1:asah1b* knockout vissen. Deze vissen vertoonden rond 12 weken na bevruchting niet dezelfde afwijkingen in houding en zwemgedrag als de *gba1* knockout vissen. De *gba1:asah1b* knockout vissen vertoonden een ongeveer 1,5x langere levensduur dan *gba1* knockout vissen. Toch vertoonden de dubbel deficiënte vissen ook abnormaal zwemgedrag rond 15-17 weken na bevruchting.

Zowel *gba1* als *gba1:asah1b* knockout vissen vertoonden vergelijkbare GlcCer accumulatie in weefsels en verhoogde expressie van de biomarkers chitinase (*chia.6*) en *gpnmb*. De infiltratie van microglia en stapelingscellen in de periventriculaire grijze zone van het optisch tectum leek ook vergelijkbaar. In het brein vertoonden de twee GCase-deficiënte vissen vergelijkbare autofagie, weerspiegeld door verhoogde eiwitniveaus van p62, en inflammatie, door verhoogde mRNA-levels van *il1-β*, *tnfβ* en *apoeb*, evenals indicaties voor een vergelijkbare activering van de complement cascade. Het ontbreken van Asah1b-ACase resulteert dus in enkele fenotypische verbeteringen, maar voorkomt niet alle afwijkingen, zoals stapelingscellen, neuroinflammatie en complement activering.

Hoofdstuk 7 geeft een overzicht van de bevindingen van zebravissen met een mutatie in genen die coderen voor GCase (*gba1*), Gba2 (*gba2*), ACase (*asah1b*) en combinaties van deze mutaties. Deze vissen zijn opgegroeid tot maximaal 12 weken oud en zowel hun fenotype als biochemische en pathologische kenmerken worden beschreven.

Vissen die drager zijn van de mutatie in *gba1* (*gba1^{+/−}*) vertoonden geen duidelijk fenotype noch biochemische afwijkingen, terwijl bij *gba2* knockout vissen alleen significante toenames werden gedetecteerd van specifieke GlcCer soorten in de hersenen.

Er werd geen duidelijk abnormaal fenotype waargenomen voor een van de GCase-deficiënte vissen tot 8 weken na bevruchting, hoewel toenames in GlcCer, neuroinflammatie en autofagie wel aantoonbaar waren. Fenotypische afwijkingen van de *gba1* knockout zebravis start rond 9 weken met een neergang van de staart en deze neergang verslechtert met de tijd, waardoor de balans en het zwemgedrag van de vis is verstoord. In tegenstelling tot de enkele *gba1* knockout vissen, ontwikkelden veel van de dubbele *gba1:gba2* knockout vissen binnen enkele dagen de ernstigere afwijkingen in het zwemgedrag, zonder de voorafgaande kenmerken zoals de progressieve daling van de staart. Deze dubbele knockout vissen hebben daarom ook een aanzienlijke kortere levensduur.

Pilot experimenten wezen op een mogelijke vroegtijdige afbraak van dopamine neuronen in de *gba1:gba2* knockout vis, maar de precieze onderliggende pathofysiologische mechanismen zijn nog onbekend.

ACase-gemedieerde deacylering van ophopende glycosfingolipiden tot de sfingolipide-basen is niet uniek voor de ziekte van Gaucher. **Hoofdstuk 8** evalueert de mogelijkheid om zebravissen te gebruiken om de ziekte van Fabry te bestuderen, een andere veel voorkomende lysosomale stapelingsziekte. Een mutatie in het gen coderend voor α -galactosidase A (α -GAL A) vormt de moleculaire basis van de ziekte van Fabry. Deze ziekte wordt gekenmerkt door lysosomale accumulatie van globotriaosylceramide (Gb3), dat gedeeltelijk door ACase wordt omgezet in globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3).

Hoofdstuk 8 toonde aan dat het genoom van de zebravis één ortholoog van humaan α -GAL A annoteert en één ortholoog van het zeer homologe α -N-acetylgalactosaminidase (α -NAGAL). De aanwezigheid van α -Gal A en α -Nagal eiwitten in zebravis cellen en larven werd bevestigd door proteomics met behulp van een op α -Gal geconfigureerde ABP. Zebravis larven en volwassen organen vertoonden een aanzienlijke α -Nagal activiteit, gemeten door hydrolyse van fluorogene α -galactoside- en α -N-acetylgalactosamine substraten. De α -Gal A activiteit is doorgaans lager dan α -Nagal activiteit, maar relatief hoog in bevruchte eieren, voortplantingsorganen, lever en nier, in vergelijking met andere weefsels. Ondanks de aanwezigheid van het α -Gal A enzym, kon het primaire substraat van α -Gal A, Gb3, gedetecteerd worden in de bestudeerde zebravis materialen zoals zebravis cellen, larven, brein, lever, nier en testis. De afwezigheid van Gb3 komt overeen met de afwezigheid van een gen dat codeert voor lactosylceramide 4- α -galactosyltransferase (A4GALT of Gb3 synthase) in zebravissen of andere vissoorten.

Om recombinant humaan en zebravis α -GAL A te bestuderen en vergelijken werden humane HEK293T cellen zonder endogeen α -GAL A gegenereerd door middel van CRISPR/Cas9 technologie. De accumulatie van endogene Gb3 waarden in deze α -GAL A deficiënte cellen werd vergelijkbaar gecorrigeerd door over-expressie van ofwel humaan α -GAL A of zebravis α -Gal A. Deze bevindingen toonden aan dat zebravis α -Gal A het endogene substraat Gb3 in de cellulaire setting kon hydrolyseren. Interessant genoeg leek het zebravis α -Gal A niet in staat om het kunstmatige substraat NBD-Gb3 te hydrolyseren bij dezelfde *in vitro* condities als humaan α -GAL A.

De rol van het geconserveerde α -galactosidase dat gecodeerd wordt door het *gla* gen in de zebravis blijft onbekend. Een toekomstig doel is om humaan A4GALT tot expressie te brengen in de zebravissen in combinatie met *gla* knockout zebravissen. Indien deze zebravissen een accumulatie van Gb3 en lyso-Gb3 vertonen, zouden ze mogelijk een model kunnen zijn om de ziekte van Fabry te kunnen bestuderen. De vergelijking van dergelijke vissen met zebravissen met een gelijktijdige *asah1b* knockout zou nuttig kunnen zijn om de specifieke impact van overmatig lyso-Gb3 in de ziekte van Fabry, zoals uitgevoerd voor GlcSph in de ziekte van Gaucher.

Hoofdstuk 9 bediscussieert de verkregen resultaten van de uitgevoerde onderzoeken en beschrijft vooruitzichten van toekomstig onderzoek. Daarnaast worden gevestigde en nieuwe technieken uitgelicht, die nuttig zouden kunnen zijn om andere veelvoorkomende klinische manifestaties van patiënten met de ziekte van Gaucher, zoals botdefecten en bloedafwijkingen, in meer detail te bestuderen in de gegenereerde GCase-deficiënte zebravis modellen. Ook worden zowel anatomische en fysiologische overeenkomsten als verschillen uiteengezet van de zebravis en zoogdieren, om zo het gebruik van het zebravis model van de ziekte van Gaucher in perspectief te plaatsen.

Tezamen tonen de onderzoeken beschreven in dit proefschrift, aan dat zebravissen aantrekkelijke nieuwe mogelijkheden bieden om mechanismen te bestuderen die ten grondslag liggen aan pathologische processen tijdens lysosomale sfingolipidoses. Vanwege anatomische en fysiologische verschillen is aannemelijk dat informatie verkregen met *gba1* knockout vissen niet rechtstreeks vertaald kunnen worden naar patiënten met de ziekte van Gaucher. Daarentegen zouden belangrijke mechanistische inzichten kunnen worden onthuld door het bestuderen van deze vis modellen. Met name de unieke *asah1b* knockout vis, die niet in staat is het veronderstelde toxische lyso-lipide te genereren, zou waardevolle inzichten kunnen geven in de rol van GlcSph, psychosine, lyso-Gb3 of andere lyso-lipiden bij het versnellen van ziekteverschijnselen.

