



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Investigations on the role of impaired lysosomes of macrophages in disease

Lienden, M.J.C. van der

Citation

Lienden, M. J. C. van der. (2021, March 18). *Investigations on the role of impaired lysosomes of macrophages in disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3152425>

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/1887/3152425>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3152425> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Lienden, M.J.C. van der

Title: Investigations on the role of impaired lysosomes of macrophages in disease

Issue Date: 2021-03-18

Appendices

Summary in Dutch

List of publications

Curriculum Vitae

Acknowledgements

Samenvatting

Het onderzoek in dit proefschrift combineert nieuwe inzichten met betrekking tot lysosomale functie en signalering vanuit lysosomen. Nieuwe visualisatie- en labelingstechnieken zijn gebruikt om lysosomale functie tijdens welzijn en ziekte in kaart te brengen. Middels een integratieve benadering is de fysiologische functie van het lysosoom als organel bestudeerd, in de context van de cel en het weefsel.

De algemene introductie beslaat de huidige kennis over de samenstelling en functie van lysosomen, met een focus op de rol van het lysosoom in de macrofaag. In deze context worden lysosomale hydrolases geïntroduceerd met de daaraan gekoppelde aangeboren lysosomale stapelingsziektes. Glucocerebrosidase en de ziekte van Gaucher worden uitgelicht als voorbeeld van een aandoening waarin lysosomale lipidenstapeling zich manifesteert in de macrofaag. Beschreven wordt hoe de status van het lysosoom gekoppeld is aan transcriptionele regulatie van het celmetabolisme via lysosoom-geassocieerde kinases. Verstoord lipidenmetabolisme, en lysosomale lipidenafbraak in het bijzonder, wordt uitgelicht als belangrijk voorbeeld van lysosomale disfunctie. De consequenties van excessieve blootstelling aan lipiden (lipotoxiciteit) worden geïntroduceerd en de gerelateerde aangeboren en verkregen metabole aandoeningen worden besproken.

Hoofdstuk 1 beschrijft de veranderde biogenese van lysosomen in gekweekte cellen door toedoen van de veelgebruikte celkweek buffer HEPES. De toename in lysosomale genexpressie wordt toegeschreven aan drie transcriptiefactoren die behoren tot de MiT/TFE familie, TFEB, TFE3 en MITF. Het effect werd onafhankelijk bevonden van mTORC1, een lysosoom-geassocieerde kinase dat MiT/TFE leden post-translationeel modificeert. In gekweekte cellen die model staan voor de macrofaag resulteert blootstelling aan HEPES in een vergroting van de vacuolaire compartiment en veranderingen in lysosomale signalering, proteolytische capaciteit, autofage flux en inflammatiesignalering. Deze veranderingen worden geïllustreerd door een verhoogde activiteit van lysosomaal glucocerebrosidase en expressie van GPNMB, een eiwit dat verhoogd is als reactie op lysosomale disfunctie. Deze bevindingen laten zien dat buffers die gebruikt worden tijdens *in vitro* kweek van cellen potentieel lysosomale functie kunnen verstoren.

In **Hoofdstuk 2** is de invloed van kweekcondities op de maturatie van GCase geanalyseerd aan de hand van een synthetisch suicide substraat met een fluorescent label, een activity-based probe (ABP). De zwitterionische buffer HEPES, eerder geïdentificeerd als lysosomale stressor, verstoort de glycaanmodificatie van GCase, waardoor de uiteindelijke 58 kDa variant niet wordt gevormd tijdens de gebruikelijke maturatie in lysosomen. Fysiologische maturatie van andere glycosidasen zoals alpha-glucosidase en beta-glucuronidase is ook verstoord in aanwezigheid van HEPES in kweekmedium. GCase accumuleert in aanwezigheid van HEPES door verminderde proteolytische afbraak. Dit fenomeen heeft potentieel gevolgen voor diagnose van Gaucherpatiënten wanneer enzymactiviteit wordt gemeten in gekweekte cellen. De GCase-activiteit in patiënt-verkregen fibroblasten die gekweekt zijn in bijzijn van HEPES kan vergelijkbaar hoog zijn met die in fibroblasten afkomstig van gezonde individuen zonder de buffer. Concluderend, voorzichtigheid moet in acht moet genomen worden bij het gebruik van HEPES bij het kweken van cellen, en in het bijzonder bij gebruik van gekweekte cellen

voor diagnose van de ziekte van Gaucher.

Hoofdstuk 3 beschrijft de visualisatie van actieve GCase moleculen door middel van correlatieve licht- en elektronenmicroscopie (CLEM). Hierbij is gebruik gemaakt van ABPs die irreversibel binden in het katalytische domein van GCase. Door fluorescentiemicroscopie met elektronenmicroscopie te combineren kan de subcellulaire lokalisatie van GCase worden vastgesteld. Het signaal van gelabeld endogeen GCase kon worden gelokaliseerd in electrodichte (endo)lysosomen. De huidige behandeling van de ziekte van Gaucher bestaat uit recombinant GCase met affiniteit voor de mannose receptor. Door therapeutisch GCase te pre-labelen met een afwijkend fluorescente ABP kon zowel endogeen als exogeen, therapeutisch enzym simultaan gelabeld worden in cellen met overexpressie van de mannose receptor. Deze methode beschrijft voor het eerst een efficiënte aflevering van recombinant GCase in individuele lysosomen die tevens endogeen GCase bevatten.

Hoofdstuk 4 geeft een overzicht van de huidige kennis over glycoproteïne non-metastatische proteïne B (GPNMB) als biomarker voor lysosomale stapelingsziekten waarin de macrofaag een centrale rol speelt. Het geglycosyleerde transmembraan eiwit is een van de meest voorkomende eiwitten in lipide-geladen macrofagen die zich ophopen in de milt van Gaucherpatiënten. Bovendien is een prominente verhoging gevonden in de hoeveelheid van een oplosbaar GPNMB-fragment in plasma van symptomatische Gaucher patiënten. In andere lysosomale stapelingsziekten waarbij stapelingscellen voorkomen is GPNMB ook (lokaal en systemisch) verhoogd, bijvoorbeeld Niemann-Pick type C. De kennis aangaande stapelingscellen in andere ziektebeelden wordt besproken, waaronder die in neurodegeneratieve aandoeningen en obesitas, waarbij lipide stapelende macrofagen ook een verhoogde expressie van GPNMB tonen.

In **Hoofdstuk 5** is de lever van muizen die deficiënt zijn in het lysosomale eiwit NPC1 gekarakteriseerd op histologisch, biochemisch en moleculair niveau. NPC1 is betrokken bij de export van lysosomaal cholesterol en een deficiëntie in dit eiwit resulteert in de lysosomale stapelingsziekte Niemann-Pick type C. De ziekte is gekarakteriseerd door lysosomale cholesterol accumulatie dat ook gepaard gaat met stapeling van andere lipiden zoals sphingomyeline en glucosylceramide. Histologische analyse bevestigde de aanwezigheid van karakteristieke stapelingsmacrofagen en morfologische veranderingen in de lever van 80 dagen oude NPC-muizen. De levers bevatten een verlaagde hoeveelheid GCase eiwit wat gepaard gaat met verlaagde enzymactiviteit in leverlysaten van NPC1-deficiënte muizen, in lijn met eerder gepubliceerde data betreffende een verlaagde GCase activiteit bij NPC-deficiëntie. Western blot analyse gaf een verhoogde aanwezigheid van lysosoom geassocieerde eiwitten te zien, waaronder GPNMB, Galectine-3 en LIMP2. Immunohistochemische analyse wees uit dat LIMP2 verhoogd was in de hepatocyt, maar niet in de lipide geladen macrofagen van dezelfde lever. LIMP2 is verantwoordelijk voor het transport van nieuw gesynthetiseerd GBA naar het lysosoom en is tevens beschreven als lysosomaal exportkanaal voor cholesterol, als alternatief voor NPC1. De in dit hoofdstuk beschreven bevindingen suggereren dat LIMP2 in de hepatocyt bij een NPC1-deficiëntie als een compensatie opgereguleerd wordt.

Hoofdstuk 6 beschrijft de moleculaire en metabole consequenties van verstoorde

lysosomale biogenese in obese adipose weefselmacrofagen. Door middel van siRNA werd de expressie van drie leden van de MiT/TFE transcriptiefactorfamilie, MITF, TFEB en TFE₃, gereduceerd in gekweekte cellen. Hiermee werd beoogd de algehele expressie van lysosomale en autofagie genen te remmen. Een van de meest afhankelijke eiwitten van MiT/TFE regulatie bleek GPNMB, een gevoelige marker voor lysosomale stress. Echter, een simultane knock-down van MITF, TFEB en TFE₃ was nodig voor opheffing van verhoogde GPNMB-expressie ten gevolge van lysosomale perturbatie, wat duidt op overlappende regulatie van genexpressie. *In vivo* siRNA-experimenten werden uitgevoerd met behulp van glucanomhulsels geladen met siRNA specifiek voor MITF, TFEB en TFE₃. Deze methode werd toegepast voor de specifieke levering van siRNA in de vetweefselmacrofagen van obese muizen. De siRNA-behandeling resulteerde in verslechtering van glucosetolerantie en in verminderde productie van adiponectine door het vetweefsel. Concluderend lijkt de MiT/TFE-gedreven transcriptie in de obese vetweefselmacrofaag een gunstige bijdrage te leveren aan de glucosegevoeligheid tijdens obesitas.

De discussie beschouwt de belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift en plaatst deze in de context van de huidige literatuur.